



Sveriges lantbruksuniversitet

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

Institutionen för kliniska vetenskaper

Förbättrad trombocyträkning hos katt med tillsats av iloprost till EDTA-blod

Kerstin Bäcklund

Uppsala

2013

Examensarbete inom veterinärprogrammet

*ISSN 1652-8697
Examensarbete 2013:23*

Förbättrad trombocyträkning hos katt
med tillsats av iloprost till EDTA-blod

Improved Analysis of Feline Platelets
with Addition of Iloprost
to Blood Taken with EDTA Collection Tubes

Kerstin Bäcklund

*Huvudhandledare: Harold Tvedten, Institutionen för kliniska vetenskaper
Biträdande handledare: Inger Lilliehöök, Klinisk kemiska laboratoriet, UDS*

Examinator: Anna Hillström, Institutionen för kliniska vetenskaper

*Examensarbete inom veterinärprogrammet, Uppsala 2013
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för kliniska vetenskaper
Kurskod: EX0736, Nivå A2E, 30hp*

*Nyckelord: trombocyter, pseudotrombocytopeni, trombocyträkning, katt, plateletkrit, iloprost, prostaglandin E1, Advia 2120, QBC Vet
Autoread, blodutstryk, räknekammare
Key words: platelets, pseudothrombocytopenia, platelet counting, feline, plateletcrit, iloprost, prostaglandin E1, Advia 2120, QBC Vet
Autoread, blood smear, Bürker chamber*

*Online publication of this work: <http://epsilon.slu.se>
ISSN 1652-8697
Examensarbete 2013:23*

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

SAMMANFATTNING.....	1
SUMMARY.....	3
INLEDNING.....	5
LITTERATURÖVERSIKT.....	6
Trombocyter	6
Hemostasen	6
Primära hemostasen.....	6
Sekundära hemostasen.....	6
Hemostasdefekter och blödningssymtom.....	6
Trombocytopeni	7
Sann trombocytopeni.....	7
Pseudotrombocytopeni.....	8
Makrotrombocytopeni hos Cavalier King Charles Spaniel.....	8
Automatisk och manuell trombocyträkning	9
Impedans.....	9
Optisk flödescytometri.....	10
Quantitative Buffy Coat.....	10
Manuell räkning.....	11
Antikoagulans och trombocyttaktiveringshämmande medel	12
EDTA.....	12
Prostaglandin E1.....	12
Iloprost.....	12
MATERIAL OCH METODER.....	13
Studiepopulation och blodprover	13
Antikoagulans och trombocyttaktiveringshämmande medel	13
Analyser	14
Manuell räknecammare.....	14
Blodutstryk.....	14
RESULTAT.....	15
Antikoagulans inverkan på trombocytaggregering	16
Advia trombocyträkning och Advia plateletkrit	17
Manuell räknecammare och trombocyträkning	20
QBC VetAutoread och trombocyträkning	21
Metodjämförelse	23
Antal katter med sann trombocytopeni	28
DISKUSSION.....	30
ACKNOWLEDGEMENTS.....	35
REFERENSER.....	35

SAMMANFATTNING

Bakgrund

Kattens trombocyter har egenskaper som gör att dagens automatiska och manuella hematologianalyser ofta ger falskt låg trombocyträkning (pseudotrombocytopeni). Trombocyträkningen (PLT) riskerar att bli missvisande låg på grund av att trombocyterna hos katter kan vara mycket större än trombocyterna hos övriga arter, samt för att kattens trombocyter in vitro ofta är så lättaktiverade att aggregat bildas. En del av de största trombocyterna räknas inte av de automatiska hematologiinstrumenten (framför allt impedanstyper) och trombocytaggregat medför att trombocyterna blir ojämnt fördelade i blodprovet. Vid sant låga trombocytvärden kan livshotande blödningar uppstå och det är därför viktigt att kunna skilja katter med sann trombocytopeni från katter med falsk trombocytopeni.

Trombocytaggregering har effektivt förhindrats med prostaglandin E1. Prostaglandin E1 är dock mycket instabilt i rumstemperatur, vilket medför att effekten lätt kan utebli vid felhantering. Nyligen presenterade en studie analogen iloprost. Iloprost är temperaturstabil och lättare att använda. Den relativa volymen trombocyter i blodet (plateletkrit, PCT) var fysiologiskt och kliniskt mer viktig när stora trombocyter (makrotrombocyter) hittades hos hundrasen Cavalier King Charles Spaniel. Katter kan också ha makrotrombocyter, och därför skulle PCT kunna utgöra ett bättre test av trombocytstatus. PCT mäts direkt av hematologiinstrumentet QBC VetAutoread (IDEXX) och indirekt av hematologiinstrumentet Advia 2120 (Siemens).

Syfte

Syftet med denna studie var att förbättra trombocyträkningen hos katter, både sett till val av antikoagulans i blodprovör och val av analysmetod. Fyra olika trombocyträkningsmetoder jämfördes för att utvärdera vilken metod som är bäst i olika situationer. Antikoagulans (EDTA utan annan tillsats (EDTA), EDTA med tillsats av prostaglandin E1 (PGE), EDTA med tillsats av iloprost (ILP)) undersökes avseende vilket/vilken kombination som medför lägst förekomst av trombocytaggregat och högst trombocyträkning. Hypotesen var att tillsats av iloprost i EDTA-rör i kombination med PCT eller optisk PLT skulle förbättra möjligheten till bedömning av kattens sanna trombocytstatus. Omfattningen av trombocytaggregat på blodutstryk och i manuell räknekammare bedömdes och jämfördes mot minskningar i PLT, med målsättning att avgöra hur många aggregat som kan accepteras för att laboratoriepersonal ska kunna svara ut ett instruments trombocyträkning.

Metoder

Blod från 35 katter togs i EDTA-rör. När tillräcklig blodvolym erhöles blandades blodet så fort som möjligt med de trombocyttaktiveringshämmande substanserna prostaglandin E1 respektive iloprost. Trombocyterna räknades med manuell räknekammare, Advia 2120 och med QBC VetAutoread. Plateletkrit presenterades direkt med QBC VetAutoread (redovisat i PLT) och indirekt med Advia. Förekomst av trombocytaggregat, sett till mängd och storlek, kontrollerades med manuell räknekammare och på blodutstryk.

Resultat

Tillsats av iloprost förbättrade blodprovskvaliteten bäst. Det påvisades fler blodprover med många och stora trombocytaggregat med EDTA utan annan tillsats, än i blodprover med tillsats av iloprost eller prostaglandin E1. ILP hade lägst förekomst av trombocytaggregat. Trombocyträkningen påverkades negativt först vid omfattande aggregatbildning (av oss klassificerad som grad 3 och 4). Resultat från optisk flödescytometri visade att 8 av 34 katters blodprov fick tydligt högre trombocyträkning med iloprosttillsats än med EDTA utan annan tillsats. I samtliga dessa 8 fall hade EDTA-blodet hög förekomst av trombocytaggregat (grad 4).

Med iloprosttillsats var korrelationen (r^2) i PLT mellan Advia och manuell räknekammare väldigt hög, 0,92 ($n = 33$). Motsvarande korrelation (r^2) med EDTA-blod utan annan tillsats var 0,85. När det förelåg omfattande trombocytaggregering redovisade manuell räknekammare högre PLT än Advia. Korrelationen (r^2) mellan Advia PCT ILP och Advia PLT ILP var lägre än förväntat. QBC PLT visade på lägst precision och korrelerade dåligt till både Advia PLT och Advia PCT.

Slutsatser

Tillsats av iloprost till EDTA hade större aktiveringshämmande effekt på trombocyter än både EDTA med tillsats av prostaglandin E1 och EDTA utan annan tillsats. Kombinationen EDTA och iloprost bedöms utgöra det bästa sättet för att minska risken för felaktig diagnostisering av trombocytopeni. Tillsats av iloprost är mycket billigare än tillsats av prostaglandin E1, och det är betydligt mer lätthanterligt.

Med vårt graderingssystem för trombocytaggregering kan laboratorierna avgöra när en trombocyträkning kan svaras ut, trots förekomst av trombocytaggregat (grad 1 och 2). Tydligt negativ påverkan på PLT sågs endast i samband med omfattande aggregering. Vid god blodprovskvalitet fungerade Advia PLT bra. Vid tydlig trombocytaggregering är rekommendationen att ta om blodprovet med tillsats av iloprost. Manuell trombocyträkning i räknekammare tycktes påverkas mindre av trombocytaggregat än räkning med automatiska hematologiinstrument.

Låg korrelation mellan Advia PLT och Advia PCT orsakades sannolikt av att MPV kan variera mycket inom denna djurart. Advia PCT bör ge en bättre bild av kattens trombocytstatus och det fysiologiska tillståndet, men fler studier krävs innan man kan fastställa vilken metod som kliniskt är mest betydelsefull. I framtiden kan blodprovörtillsats med iloprost i kombination med PLT och/eller PCT från optiska instrument (som Advia) komma att utgöra det bästa alternativet för bedömning av trombocytstatus hos katt. QBC VetAutoread fungerade, enligt resultaten i denna studie, och i motsats till nyttan hos Cavalier King Charles Spaniel, inte bra för bedömning av trombocyter hos katt.

SUMMARY

Background

The platelets of the cat have traits that cause both automatic and manual methods to report falsely low platelet countings (pseudothrombocytopenia). The platelet count can be misleadingly low because feline platelets often are much larger than platelets among other species, and because the platelets of the cat are easily activated in vitro to form aggregates. The largest platelets are missed by automatical hematology instruments, especially impedance types, and platelet aggregates means the platelets are not evenly distributed in the sample. When true thrombocytopenia is present, lifethreatening bleedings can develop. Therefore it is important to differ cats with true thrombocytopenia from cats with false thrombocytopenia.

Formation of platelet aggregates have been successfully prevented with prostaglandin E1. However prostaglandin E1 is very instabile in room temperature, and incorrect handling of prostaglandin E1 can neutralize its effect. Recently a study recommended use of the analogue iloprost. Iloprost is temperature stabile, easier to handle and less likely to lose its effect. The relative volume of platelets in blood (plateletcrit in %) was more physiological and clinically important when large platelets (macrothrombocytes) were found in Cavalier King Charles Spaniel dogs. Cats also have macrothrombocytes, therefore plateletcrit may be a better test of platelet status. Plateletcrit is measured directly by the QBC VetAutoread (IDEXX) and indirectly by the Advia 2120 (Siemens).

Objectives

The goal of this study was to improve platelet counting among cats by comparing types of anticoagulation in blood collection tubes and different analytic methods. Four different methods for platelet counting were compared to see which gave the highest and most consistent results. The anticoagulation types (EDTA without other additive (EDTA), EDTA with additive of prostaglandin E1 (PGE), EDTA with additive of iloprost (ILP)) were evaluated to give the least formation of platelet aggregates and the highest platelet counts. The hypothesis was that an addition with iloprost in EDTA collection tubes, in combination with plateletcrit or optical platelet counting, would contribute to a higher, and more likely true, platelet count. The severity of platelet aggregation on a blood smear or in the manual bürker chamber was classified and compared to reduction in PLT with a goal of determining how many aggregates could be acceptable and permit a laboratory to report the instrument's PLT.

Methods

Blood from 35 cats was first collected into tubes containing EDTA. When sufficient blood was available it was divided into three parts and as quickly as possible mixed with iloprost respective prostaglandin E1. The platelets were counted with a manual bürker chamber, Advia 2120 and QBC VetAutoread. The plateletcrit was reported indirectly by the Advia, and directly by the QBC VetAutoread (though reported as PLT). The presence of platelet aggregates, with attention to both number and size, was determined with the bürker chamber and on blood films.

Results

Addition of iloprost improved the blood sample quality best. There were more blood samples with many and large platelet aggregates with EDTA without another additive, than in blood samples with an additive with iloprost or prostaglandin E1. ILP blood had the fewest samples with aggregates. The platelet counting was overtly negatively affected only when there was extensive aggregate formation (grades 3 and 4 of our classification system). The results from the optical flow cytometry showed that 8 of 34 cat blood samples had clearly higher platelet counts with additive with iloprost than with EDTA with no additive. In all 8 cases, the EDTA blood had extensive aggregate formation (grades 4 of our classification system).

Comparing samples with addition of iloprost as the best samples, the correlation (r^2) of PLT between Advia and the manual method was very good at 0,92 ($n = 33$). The correlation (r^2) was 0,85 with EDTA without another additive. When there was extensive platelet aggregation, the manual bürker chamber reported higher PLT than Advia. The correlation (r^2) between Advia PCT and Advia PLT was lower than expected. QBC PLT showed the greatest imprecision and the correlation to both Advia PLT and Advia PCT was low.

Conclusions

EDTA with additive of iloprost had a superior effect in inhibiting platelet activation than both EDTA with additive of prostaglandin E1 and EDTA without other additive. An additive of iloprost is considered to be the best alternative to reduce the risk of false diagnoses of thrombocytopenia. Addition of iloprost is much cheaper than prostaglandin E1, and it is much easier to handle.

Our aggregation grading system should be useful for deciding when a laboratory may report a PLT despited mild aggregation (grades 1 and 2). Prominent decreases in PLT was only seen in connection with extensive platelet aggregation. With blood samples of good quality, the Advia PLT worked well. When extensive platelet aggregation occurs our recommendation is to resample the patient using ILP. Manual PLT appeared less affected by severe platelet aggregation than instrument PLT.

Advia PLT and PCT gave different indications of platelet amount in the same samples. This was indicated by low correlation between Advia PLT and Advia PCT. The difference is likely influenced by great varies in MPV within this species. The Advia PCT may better reflect the feline platelet mass and physiologic response, but further work is needed to determine which method may be clinically most important. The optimal feline counting system for the future may be addition of iloprost in blood collection tubes in combination with PLT and/or PCT with optical methods (laser based flow cytometers like Advia). The QBC VetAutoread did, according to the results in this study, and in contrast to the use for Cavalier King Charles Spaniel dogs, not work well for evaluation of platelets among cats.

INLEDNING

Nuvarande metoder för trombocyträkning av kattblod som tas i EDTA-rör ger ofta missvisande lågt resultat (pseudotrombocytopeni). Pseudotrombocytopenin beror bland annat på att katt-trombocyter in vitro är lättaktiverade vilket ökar risken för aggregatbildning. Trombocytaggregat har påvisats i över 50% av tagna blodprover (Norman *et al.*, 2001a; Zelmanovic & Hetherington, 1998). Aggregat riskerar att registreras som leukocyter (Norman *et al.*, 2001b), alternativt att inte registreras alls (Powell & Torrance, 2012). Kattens mean platelet volume (MPV) kan dessutom variera mycket (Weiser & Kociba, 1984; Zelmanovic & Hetherington, 1998). Varierande cellstorlek gör att somliga automatiska hematologiinstrument registrerar stora trombocyter som erythrocyter (Weiser, 1983; Welles *et al.*, 1994; Norman *et al.*, 2001a). Ibland är trombocyterna så stora att instrumenten inte upptäcker dem. Tasker *et al.* (1999, 2001) angav manuell hemacytometer som gold standard. Med manuell och optisk räkning kan man upptäcka stora trombocyter (Lilliehöök & Tvedten, 2009), men i och med att det blir omöjligt att identifiera individuella trombocyter påverkas även optisk och manuell metod negativt av aggregat (Norman *et al.*, 2001a; Tasker *et al.*, 2001).

Sann trombocytopeni med värden $< 200 \times 10^9/L$ tycks vara ovanligt hos katter. Med manuell bedömning av EDTA-blod har prevalensen uppskattats från 1,2% (Jordan *et al.*, 1993) till 3,1% (Norman *et al.*, 2001a). I och med att kraftig trombocytopeni kan orsaka livsfarliga blödningar är det viktigt att upptäcka sant låga värden. Med dagens tillgängliga hematologianalyser riskerar trombocytsvaret att negligeras med antagande att mätantalet sannolikt är falskt lågt. Svar om låg trombocyträkning kan även resultera i att veterinären finner det indikerat med ytterligare undersökningar, något som kan vara kostsamt för både djurägare och försäkringsbolag.

Få men stora trombocyter, makrotrombocytopeni, har påvisats hos hundraserna Norfolk terrier (Gelain *et al.*, 2010) och Cavalier King Charles Spaniel (CKCS) (Pedersen *et al.*, 2001; Cowan *et al.*, 2004). Trots lågt trombocytantal har hundarna en normal plateletkrit (PCT) (Bertalozzo *et al.*, 2007; Tvedten *et al.*, 2008; Gelain *et al.*, 2010). PCT visar den totala massan trombocyter i blodet. För en välfungerande hemostas är det viktigare att ha normal trombocytmassa än ett normalt trombocytantal (Powell & Torrance, 2012). PCT föreslås vara den bästa metoden för att bedöma kliniskt relevant trombocytopeni hos CKCS (Bertalozzo *et al.*, 2007; Tvedten *et al.*, 2008).

Syftet med denna studie var att förbättra trombocyträkningen (PLT) hos katt. En viktig del var att undersöka om PCT hos katt, liksom hos CKCS, ger en bättre bild av trombocytstatus än PLT. PCT bedömdes både med Advia 2120 (Siemens) och med QBC VetAutoread (IDEXX). En annan målsättning var att jämföra olika trombocyträkningsmetoder för att fastställa vilken som är mest trovärdig beroende på situation. Tidigare studier har visat att automatiska hematologiinstrument som klassificerar celler med hänsyn till både storlek och komplexitet (optisk flödescytometri), som Advia 2120, är mycket bättre på att detektera stora trombocyter än automatiska hematologiinstrument som klassificerar celler efter enbart cellstorlek (impedans) (Tvedten *et al.*, 2008; Lilliehöök & Tvedten, 2009; Tvedten & Johansson, 2010).

Stora trombocyter, och även trombocyttaggregat, kunde även upptäckas med manuell räknekammare och på blodutstryk. I och med att korrekt trombocyträkning bara kan göras på kattblod utan aggregat (Norman *et al.*, 2001a), tillsatte vi trombocytaktiveringshämmande medel, prostaglandin E1 respektive iloprost, till EDTA-rör. Antikoagulans/antikoagulans med tillsats som jämfördes var därmed EDTA utan annan tillsats (EDTA), EDTA med tillsats av prostaglandin E1 (PGE), respektive EDTA med tillsats av iloprost (ILP).

Effekten av ILP och PGE utvärderades med hypotesen att de prover som hade dessa tillsatser skulle resultera i högre PLT och/eller högre PCT än EDTA. De olika analysmetoderna jämfördes med hypotesen att den metod som gav högst PLT eller högst PCT är den metod som närmast återspeglar djurets verkliga trombocytstatus. I och med att automatiska hematologiinstrument som Advia 2120 kan ha svårt att räkna större trombocyter hos katt, antogs att QBC med PCT är en bättre metod. Vid analys med Advia 2120 beräknas PCT indirekt utifrån instrumentets direkta förmåga att upptäcka trombocyter (storleksgräns 60 fl). Vid QBC är förhållandet tvärtom, med PCT som anges direkt och trombocytantalet indirekt.

LITTERATURÖVERSIKT

Trombocyter

Trombocyter har en viktig roll i hemostasen. Cellerna är anukleära och bildas i benmärgen genom avknoppning från megakaryocyter. Megakaryocyter härstammar från stamceller som regleras av peptidhormonet trombopoietin (TPO). TPO bildas i levern.

Hemostasen

Hemostasen delas traditionellt in i primär och sekundär hemostas samt fibrinolys. Trombocyterna har en mycket viktig roll i den primära hemostasen vid bildning av en sårtäckande, men labil, plugg.

Primära hemostasen

Vid kärlskada blottas subendotelialt kollagen, och glatta muskelceller i kärlväggen stimuleras till vasokonstriktion. Blottnings av kollagen stimulerar adhesion av trombocyter. Vasokonstriktion minskar blodflödet till området, vilket främjar både trombocyttaggregering och trombocytadhesion. Intakta endotelceller intill kärlskadan frisätter ett enzym som omvandlar arachidonsyra till prostaglandinmetaboliten prostacyklin (Sjaastad *et al.*, 2003). Prostacyklin bidrar till att motverka aggregering och begränsar därigenom trombocytpluggens storlek så att den inte sträcker sig för långt i kärlet.

Sekundära hemostasen

Sekundära hemostasen innebär stabilisering av trombocytpluggen till ett olösligt koagel. Ett koagel bildas med hjälp av koagulationsfaktorerna och deras slutprodukt, ett nätverk av fibrin.

Hemostasdefekter och blödningssymtom

Blödningsrubbingar kan ha sitt ursprung i den primära eller i den sekundära hemostasen. Den vanligaste orsaken vid rubbing i den primära hemostasen är trombocytopeni (Nelson & Couto, 2009). Kärlddefekter eller nedsatt trombocytfunktion orsakar sällan spontana blödningar hos katt.

Blödningar som beror på avvikelser i den primära hemostasen yttrar sig annorlunda jämfört med blödningar som beror på avvikelser i den sekundära hemostasen (Nelson & Couto, 2009). Vid defekter i den primära hemostasen kan djuret uppvisa symtom som blödningar i och från hud och slemhinnor, exempelvis petechier, eccymoser, näsblod, hematuri, hematochezia och melena. Man kan även se förlängd blödningstid direkt efter blodprovstagning. Detta att jämföra med kliniska symtom vid defekter i den sekundära hemostasen varvid det är vanligare med hematom, blödningar in i leder, muskler och kroppshålor samt försenad blödning efter blodprovstagning. I en studie av Kohn *et al.* (2006) hade sju av 42 katter (17%) med trombocytopeni spontana blödningar. Dessa katter hade signifikant lägre trombocytantal ($< 57 \times 10^9/L$) än de katter med trombocytopeni som inte hade spontana blödningar. Jordan *et al.* (1993) fann spontana blödningar hos nio av 41 katter (22%) med trombocytopeni. Ofta hade dessa katter en trombocyträkning på $< 30 \times 10^9/L$.

Trombocytopeni

Det är vanligt att automatiska hematologiinstrument vid analys av kattblod varnar om trombocytopeni. I många fall är larmen dock falska (pseudotrombocytopeni) och beror på en kombination av aggregatbildning samt mätinstrumentets oförmåga att särskilja trombocyter från erythrocyter. I en studie om hundrasen CKCS fann Tvedten *et al.* (2008) att hematologisvar som larmar om trombocytopeni kan variera mellan 0-66% beroende på mätmetod.

Sann trombocytopeni

Gränsen för trombocytopeni hos katt definierades i två studier som $< 200 \times 10^9$ trombocyter per liter blod (Jordan *et al.*, 1993; Norman *et al.*, 2001a). Resultaten baserades i båda studierna på manuell räkning i räknekammare eller på blodutstryk. Enligt den ena studien hade 1,2% av 3300 katter trombocytopeni (Jordan *et al.*, 1993), medan prevalensen i den andra studien bedömdes till 3,1% bland 256 katter (Norman *et al.*, 2001a).

Trombocytopeni kan bero på minskad produktion i benmärgen, ökad förbrukning eller ökad nedbrytning (Nelson & Couto, 2009). Sjukdomar associerade med trombocytopeni hos katt är bland annat infektioner, neoplasier och immunmedierade tillstånd (Jordan *et al.*, 1993). Individer med infektionssassocierad trombocytopeni tycks i regel vara yngre än de katter vars trombocytopeni kan relateras till tumörer. Infektionssjukdomarna orsakas bland annat av felint leukemivirus (FeLV), felint coronavirus (FCoV), felint immunbristvirus (FIV) och felint panleukopenivirus (FPLV). Identifierade neoplasier är bland annat leukemi och hemangiosarkom. Norman *et al.* (2001a) fann, utöver sambandet till neoplasier och infektionssjukdomar, även katter vars trombocytopeni kunde relateras till kemoterapi.

Disseminated intravascular coagulation, DIC, har konstaterats hos 12% av katter med låga trombocytvärden (Jordan *et al.*, 1993).

Tecken på sekundär immunmedierad trombocytopeni har återfunnits hos trombocytopeniska katter med antikroppar riktade mot sina trombocyter (Kohn *et al.*, 2006). Hos somliga av dessa katter påvisades samtidig infektionssjukdom eller neoplas. Infektionssjukdomar orsakades bland annat av virus som FIV, FeLV eller FCoV, nybildningar utgjordes av lymfom eller leukemi.

Pseudotrombocytopeni

Svårigheter med trombocyträkning har rapporterats förekomma med flera olika mätmetoder. I ett flertal studier har man jämfört metoderna sinsemellan i försök att utvärdera vilken som presenterar en trombocyträkning närmast det sanna antalet.

Bland flertalet av våra husdjur är trombocyterna markant mindre än erythrocyter, med ett volymförhållande på 1:10 (Sjaastad *et al.*, 2003). Enligt blodutstryk kan dock storleken på kattens trombocyter variera mycket (Weiser & Kociba, 1984). I en studie såg man på fyra av sex blodutstryk (66,7%) signifikant överlappande cellstorlek mellan trombocyter och erythrocyter (Zelmanovic & Hetherington, 1998). Här fann man även, med flödescytometri omfattandes 48 katter, att mean platelet volume (MPV) var signifikant högre för aggregerade trombocyter ($18,3 \pm 2,6$ fl) jämfört med MPV för icke aggregerade trombocyter ($14,2 \pm 1,3$ fl) ($P < 0,0001$). Även Norman *et al.* (2001b) har demonstrerat att oaggregerade trombocyter har lägre MPV. Prevalensen aggregat i kattblodprov har rapporterats vara $> 50\%$ (Norman *et al.*, 2001a) och 67% (Zelmanovic & Hetherington, 1998). Varierande trombocytstorlek och förekomst av aggregat gör det svårt för automatiska hematologiinstrument att typbestämma och räkna cellerna. Impedansmätning, som delar in celler efter bara cellstorlek, tycks till exempel ge mindre tillförlitlig trombocyträkning än optisk mätning (Tvedten *et al.*, 2008; Lilliehöök & Tvedten, 2009; Tvedten & Johansson, 2010).

Ytterligare faktorer som har föreslagits påverka trombocyträkningen är provtagningssätt, typ av antikoagulans i provtagningsröret, tillsats av trombocytaktiveringshämmande medel, och förvaringstid innan analys. Förvaringstid tycks inte ha negativ påverkan på trombocyträkningen. Weiser & Kociba (1984) fann att trombocyträkningen i blod taget med EDTA-rör sjönk under fyra timmars förvaring, men sambandet var inte signifikant. När man i en annan studie jämförde resultaten på skickade blodprov tagna i EDTA-rör med prover som hade analyserats under provdagen, fann man ingen korrelation mellan förvaringstid och sjunkande trombocyträkning (Norman *et al.*, 2001a). Beträffande provtagningssätt tyder nyare forskning på att det inte har någon påverkan på aggregering och trombocyträkning (Riond *et al.*, 2012b).

Makrotrombocytopeni hos Cavalier King Charles Spaniel

En hög andel CKCS har få men stora trombocyter (Pedersen *et al.*, 2002; Cowan *et al.*, 2004), ett tillstånd kallat makrotrombocytopeni (Pedersen *et al.*, 2002). Trombocytantalet har hos CKCS med makrotrombocyter påvisats vara signifikant lägre än hos CKCS med normalstora

trombocyter (Cowan *et al.*, 2004). För att hemostasen ska fungera bra är det dock viktigare med en normal total trombocytmassa (PCT) än ett visst trombocytantal (Powell & Torrance, 2012), och tillståndet med makrotrombocytopeni ska inte vara relaterat till ökad blödningsbenägenhet (Pedersen *et al.*, 2002; Cowan *et al.*, 2004; Bertalozzo *et al.*, 2007).

Med manuell hemacytometer har prevalensen trombocytopeni ($< 100 \times 10^9/L$) hos CKCS påvisats vara mellan 51% (Cowan *et al.*, 2004) och 56% (Pedersen *et al.*, 2002). Strax över 30% har makrotrombocyter (Cowan *et al.*, 2004; Bertalozzo *et al.*, 2007). I en studie om CKCS och makrotrombocyter jämförde man trombocyträkningen vid mikroskopundersökning med de tre hematologiinstrumenten impedans, lasercellsmätning och QBC VetAutoread (Bertalozzo *et al.*, 2007). QBC, som anger trombocytantal efter blodprovets PCT, gav signifikant högre PLT än övriga metoder. Skillnaden i de olika metodernas förmåga att räkna trombocyter framgick tydligast när man jämförde impedans med QBC (Tabell 1).

Tabell 1. Jämförelse av trombocyträkningsresultat hos CKCS, sett till val av hematologiinstrument (efter Bertalozzo *et al.*, 2007)

Hematologimetod	Trombocyträkning, median ($\times 10^9/L$)	Andel (%) CKCS med $PLT < 100 \times 10^9/L$
Impedans	136	34,1
QBC	292	5,8

Tvedten *et al.* (2008) bekräftade att QBC är bättre än impedans vid bedömning av trombocytstatus hos CKCS. Enligt ett impedansinstrument hade 44% av deltagande CKCS ett trombocytantal på $< 10 \times 10^9/L$, medan ingen av hundarna hade trombocytopeni enligt QBC. För att identifiera CKCS med sann trombocytopeni kan trombocyträkning som baseras på PCT vara den bästa analysmetoden (Bertalozzo *et al.*, 2007; Tvedten *et al.*, 2008), för trots låg PLT kan CKCS ha normal PCT (Bertalozzo *et al.*, 2007). Nyligen visade man att även Advia 2120 kan göra en relativt säker PCT-bedömning hos CKCS (Tvedten *et al.*, 2012). För CKCS med de allra största trombocyterna hände det dock att instrumentet redovisade en sannolikt falskt låg PCT.

Automatisk och manuell trombocyträkning

Enligt studier har även trombocyträkning på kattblod varierat beroende på mätmetod. Mätmetoder som har studerats är bland annat automatiska hematologiinstrument som impedans, optisk flödescytometri och QBC, och manuella metoder som räknekammare och blodutstryk.

Impedansmätning

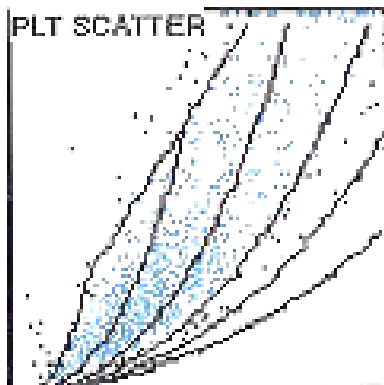
I en av studierna om olika trombocyträkningsmetoder hos CKCS analyserade man deltagande hundars blodprover med impedansmätning, optisk mätning, QBC och manuell räkning, varefter resultaten jämfördes (Tvedten *et al.*, 2008). Av de sex metoder som användes gav de två impedansinstrumenten (Sysmex XT-2000iV och CELL-DYN 3500) de lägsta trombocyträkningarna. Även Gelain *et al.* (2010) dokumenterade att impedansanalys av makrotrombocyter kan ge falskt låg trombocyträkning, sannolikt på grund av att stora

trombocyter kan missbedömas som erythrocyter. Makrotrombocyterna identifierades i detta fall inom en grupp Norfolk terriers.

Vid analys av kattblod har liknande resultat erhållits. I en retrospektiv studie med blod från 359 katter hade 71%, enligt impedansmätning, trombocytopeni med $< 200 \times 10^9/L$ (Norman *et al.*, 2001a). Vid jämförelse på blodutstryk fann man i stället en trombocytopeniprevalens på 3,1%. Pseudotrombocytopeni förelåg således hos 68,2%. Att impedansinstrument ofta ger falskt låg trombocyträkning antogs bero på en kombination av trombocytaggregat och cellindelning baserad på enbart cellstorlek. Tasker *et al.* (2001) fann att impedansräkning av trombocyter i EDTA-blod hade hög sensitivitet men låg specificitet för detektion av trombocytopeni. Många av studiens katter fick ett resultat förenligt med trombocytopeni, trots ett normalt trombocytantal.

Optisk flödescytometri

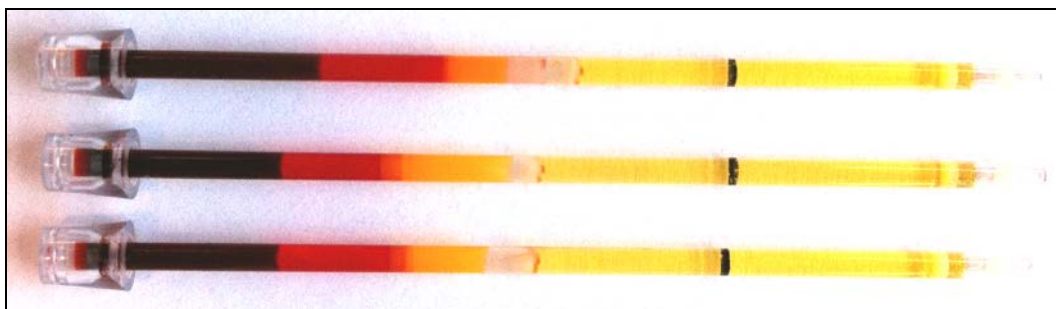
Optisk flödescytometri sorterar, till skillnad från impedansinstrument, inte bara celler efter storlek. Den ser även till cellens refraktära index (Figur 1). Genom detta ska trombocyter skiljas från erythrocyter i högre utsträckning. Att fler stora trombocyter inkluderas i räkningen vid optisk flödescytometri än vid impedansmätning har bekräftats i flera studier (Tvedten *et al.*, 2008; Lilliehöök & Tvedten, 2009; Tvedten & Johansson, 2010). Med det optiska hematologiinstrumentet Advia 2120 kan man indirekt även få ut PCT, baserat på PLT och MPV. Trombocyter upp till storleken 60 fl ska registreras.



Figur 1. Cytogram från det optiska flödescytometriinstrumentet Advia 2120. Varje blå prick motsvarar en trombocyt. Ökande cellstorlek redovisas på den vertikala axeln, medan ökande cellkomplexitet redovisas på den horisontella axeln.

Quantitative Buffy Coat

Quantitative buffy coat (QBC) VetAutoread är ett hematologiinstrument vars trombocyträkning baseras på blodprovets relativa trombocytvolym, plateletkrit (PCT). PCT anges i %. QBC svarar dock ut i $PLT \times 10^9/L$, utifrån sambandet $PCT = PLT \times MPV$, där MPV har standardiserats för varje djurslag. Mätning av trombocytmassan sker efter centrifugering av blod i hematokritrör. Centrifugeringen gör att celler av olika densitet hamnar i olika lager (Figur 2). Blodcellerna färgas in med acridinorange och fluorescerar sedan olika.



Figur 2. Centrifugerade QBC hematokritrör från tre olika katter. Längst till vänster återfinns erythrocyter (mörkrött och rött område). Därefter följer buffy coat med leukocyter (orange område) och trombocyter (gult område innan ljusrosa plastflötör). Bredden av trombocytlagret används till att bedöma PCT och sedan PLT. Till höger om plastflötören syns plasman.

Översättningen från plateletkrit till trombocytantal blir dock endast korrekt om trombocyterna hos den enskilda individen är av samma storlek som djurslagets standardiserade medelstorlek (Tvedten *et al.*, 2008). CKCS med makrotrombocyter har med QBC fått en normal trombocyträkning (Bertalozzo *et al.*, 2007; Tvedten *et al.*, 2008), och Bertalozzo *et al.* (2007) menar att trombocyträkningen hos sådana hundar sannolikt är falskt hög. I studien om Norfolk terriers med makrotrombocyter blev QBC-instrumentets trombocyträkning signifikant högre än både mikroskopisk undersökning och impedans (Gelain *et al.*, 2010).

Hos katt har QBC VetAutoreads specificitet och sensitivitet för detektion av trombocytopeni bedömts vara 97,4% respektive 44,4% (Tasker *et al.*, 2001). Detta tolkades innebära att katter med normalt trombocytantal ofta identifieras, medan katter med sann trombocytopeni i stället riskeras att missas.

Manuell räkning

Manuell bedömning av trombocyter kan ske med manuell räknekammare (Figur 3) och med blodutstryk. Med båda metoderna kan man uppskatta antalet trombocyter, bedöma dess morfologi som storlek och tecken på aktivitet, samt notera eventuell förekomst av trombocyttaggregat. På blodutstryk återfinns trombocyttaggregat huvudsakligen i fransen.

Blodutstryk har föreslagits vara en snabb och enkel metod för trombocyträkning (Tasker *et al.*, 1999), och hos katt har manuell metod även angetts som gold standard (Tasker *et al.*, 1999; Tasker *et al.*, 2001). För att identifiera katter med sann trombocytopeni rekommenderade Norman *et al.* (2001a) blodutstryk framför impedans. Vid jämförelse med optisk räkning på prover utan trombocyttaggregat har dock räkning på blodutstryk sämre precision (Tvedten, H., pers. medd., 2012). En nackdel med manuell räknekammare är att trombocyttaggregat kan missas om de är ojämnt spridda i blodprovet (Lilliehöök & Tvedten, 2009).



Figur 3. Fotografi av ett synfält från en manuell räknekammare. I förstoringen till vänster syns en stor cell med granulerad kärna (leukocyt). Runt leukocyten ser man celler med ljus ytterkant och mörkare centrum (erythrocyter). De tre ljusa cellerna med homogent cytoplasm innehåll motsvarar tre trombocyter av varierande storlek (se pilar).

Antikoagulans och trombocytaktiveringshämmande medel

EDTA

EDTA är det antikoagulans som är mest använt. Koagulering förhindras genom att Ca^{2+} binds upp (Jones, B., 2010). Ca^{2+} behövs för koagulationsfaktorerna i den sekundära hemostasen.

Prostaglandin E1

Prostaglandin E1 är en värmekänslig metabolit av arachidonsyra. Vid tillsats av prostaglandin E1 i antikoagulans trisodiumcitrat 3,8%, blev katt-trombocyter omedelbart och persisterande motståndskraftiga för aktivering av agonisterna ADP och kollagen (Welles *et al.*, 1994). Aggregering förhindrades och trombocyträkningen förbättrades. Även Tvedten & Johansson (2010) fann att antikoagulanstillsats med prostaglandin E1 förbättrar trombocyträkningen hos katter i kliniska situationer. I denna studie användes kombinationen prostaglandin E1 och EDTA. Trombocyträkning på blod taget i EDTA med tillsats av prostaglandin E1 blev högre både vid analys med optisk cytometri och med impedans, jämfört med när bara EDTA hade använts. Allra högst trombocytantal erhöles genom antikoagulans EDTA med tillsats av prostaglandin E1 och analys med optisk räkning, vilket därmed föreslogs vara gold standard för att vid misstanke bekräfta sann trombocytopeni hos katt.

Iloprost

Iloprosttrometamol verkar, liksom som den endogena substansen prostacyklin, hämmande på trombocyttaggregering (Fass, 2012). På kongressen "International Society for Animal Clinical Pathology" i Ljubljana, Slovenien, juli 2012, presenterades en studie i vilken man hade provtagit katter med vanliga EDTA-rör samt med EDTA-rör med tillsats av iloprost (Riond *et*

al., 2012a). Blodet analyserades med både automatisk och manuell räkning. Man fann att iloprost tillsammans med EDTA är mycket effektivt mot aggregatbildning i kattblod. I blod som hade samlats i EDTA-rör utan iloprost var förekomsten pseudotrombocytopeni 50%. Allt blod som hade samlats i EDTA-rör med iloprost fick trombocytvärden inom normalt referensintervall.

MATERIAL OCH METODER

Studiepopulation och blodprover

Ett venöst blodprov togs från 33 sjuka och 10 friska katter, huvudsakligen från vena cephalica, i enstaka fall från vena jugularis. Kanylstorlek och provtagningssätt var inte standardiserat. Blodflödet bedömdes vid samtliga tillfällen av en och samma person, och klassificerades som "något mindre bra än önskvärt", "bra", "bättre än bra" eller "mycket bra". Prover där blodflödet in i provröret var mycket långsamt användes inte i studien, och antalet blodprover som analyserades för studien blev 35 stycken. På grund av tissue factors medverkan i koagulationen försökte man undvika att samla de första dropparna efter kanylstick. Målsättningen var att få minst 2,5 ml blod per individ. I enstaka fall erhöles endast runt 1,5 ml.

De sjuka katterna provtogs endast i samband med sjukdomsutredning på Universitetsdjursjukhuset, SLU. Friska katter fick delta under förutsättning att de vid blodprovtagningstillfället inte hade någon känd sjukdom med allmänpåverkan och inte stod på NSAID- eller kortisonbehandling. En fullständig hematologi gjordes ur vilken man hade möjlighet att fånga upp eventuella tecken på pågående sjukdom. Projektet var godkänt av djurförsöksetiska nämnden och medverkan skedde efter frivillig anmälan av katternas ägare.

Antikoagulans och trombocytaktiveringshämmande medel

EDTA är den typ av antikoagulans som är vanligast för hematologisk profil. Med anledning av detta valdes, i stället för CTAD eller citrate, EDTA även för dessa analyser. I början av studien lät man blodet rinna ned i ett med iloprost 2-4 μ L (Ilomedin 20 μ g/ml) förpreparerat 0,5ml EDTA-rör (ILP) samt ett opreparerat 2ml EDTA-rör (EDTA). EDTA-röret med tillsats av iloprost fylldes med blod innan röret med EDTA utan annan tillsats. De två blodprovsrören vickades varsamt 10-20 gånger så att blodet skulle blandas med EDTA utan annan tillsats respektive med EDTA med tillsats av iloprost. I fall när en blodvolym om minst 1,4ml uppskattades ha erhållits i röret med EDTA utan annan tillsats, pipetterade man efter vickning över minst 0,6ml blod till ett eppendorfrör förpreparerat med prostaglandin E1-etanolösning (100 μ g i 20 μ L etanol) och vaggade detta (PGE) 10-20 gånger.

På grund av att prostaglandin E1 inaktiveras av värme förvarades förpreparerade prostaglandin E1-rör i frys (-18°C) tills information om nära förestående blodprovstagning. Under perioden mellan uttagning från frys och blodprovstagning transporterades röret med prostaglandin E1 i en frigolitlåda med kylklampar. Röret med prostaglandin E1 togs fram för tining inom en minut efter blodprovstagning och inom samma tidsram fördes delar av blodet från EDTA utan annan tillsats över till röret med prostaglandin E1 (PGE).

Efter blodinsamling från sju katter övergick man vid provtagning till att låta hela blodprovsvolymen rinna ned i ett opreparerat 2-3 ml EDTA-rör (EDTA). EDTA vaggades 10-20 gånger. Därefter fördelades blodet, inom tre minuter från provtagning, mellan EDTA samt ett kryo- eller eppendorfrör förpreparerat med 2µL iloprost, respektive ett eppendorfrör förpreparerat med prostaglandin E1. Rören med iloprost och prostaglandin E1 vaggades varsamt 10-20 gånger vardera så att blodet blandades med tillsatserna.

EDTA-rör med tillsats av iloprost respektive kryorör och eppendorf med iloprost förvarades under hela studieperioden i rumstemperatur. Nyreparering av rör med iloprosttillsats 2µL skedde kontinuerligt.

Analyser

Samtliga blodprover avsågs att analyseras med Advia 2120 (Siemens Healthcare Diagnostics, Deerfield, IL, USA), QBC VetAutoread (IDEXX Laboratories, Westbrook, ME, USA) och manuell räknekammare (Hecht, Sondheim, Tyskland) inom tre timmar. Blodutstryk gjordes inom två timmar. Provhanteringen var inte blindad. Manuell räknekammare och Advia 2120 utfördes av biomedicinska analytiker (BMA). Statistik beräknades med Microsoft Excel 2008.

Manuell räknekammare

Blodet spädades med leucoplate (Sobioda, Montbonnet, France), spädning 1:20, blod:spädningsvätska. Provspädningen fick stå i 20 minuter för erythrocytlysering. Därefter fördes en droppe av provspädningen över till räknekammaren, som i sin tur fick stå i en fuktig kammare i 20 minuter för sedimentering av trombocyterna. Efter sedimentering bedömdes trombocyterna i ett ljusmikroskop med 40x förstoring. Totalantalet trombocyter räknades i 16 CD-rutor, och antalet trombocytaggregat räknades i hela klacken.

Blodutstryk

Blodutstryken färgades med Giemsa. Bedömning av blodprovskvaliteten gjordes genom kontroll och räkning av eventuella trombocytaggregat i fransen och i fem stycken monolayerområden.

Fransarna bedömdes med förstoring 4x och 10x. Aggregat som bestod av 5-20 trombocyter definierades som små till mellanstora. Aggregat som bestod av > 50 trombocyter definierades som stora. Blodprovskvaliteten i fransen klassificerades sedan enligt tabellen nedan (Tabell 2).

Tabell 2. Klassificering av blodprovskvalitet sett till antal trombocytaggregat i blodutstrykets frans

Trombocytaggregat	Klassificering
Avsaknad av synliga aggregat	0
< 5 små till mellanstora aggregat	1
> 5 små till mellanstora eller 1-2 stora aggregat	2
3-10 stora aggregat	3
> 10 stora aggregat	4

Fem stycken monolayerfält per blodutstryk bedömdes med förstoring 100x med immersionsolja. Aggregat som bestod av 3-5 trombocyter definierades som små. Aggregat som bestod av > 5 trombocyter definierades som stora. Blodprovskvaliteten klassificerades sedan enligt tabell 3. Slutlig bedömning av monolayer erhöles genom att beräkna genomsnittet trombocytaggregat i dessa fem monolayerfält.

Tabell 3. Klassificering av blodprovskvalitet sett till genomsnittet trombocytaggregat från fem monolayerfält

Trombocytaggregat	Klassificering
Avsaknad av aggregat	0
< 2 små aggregat	1
2-5 små eller < 2 stora aggregat	2
2-5 stora aggregat	3
> 5 stora aggregat	4

När resultat från Advia och manuell räknekammare indikerade eventuell trombocytopeni kontrollräknades antalet trombocyter i tio stycken fält från monolayer, förstoring 100x med immersionsolja. Genomsnittet trombocyter multiplicerades med faktor 15 för att få ungefärligt antal ($\times 10^9$) trombocyter per liter blod (Webb *et al.*, 2004).

RESULTAT

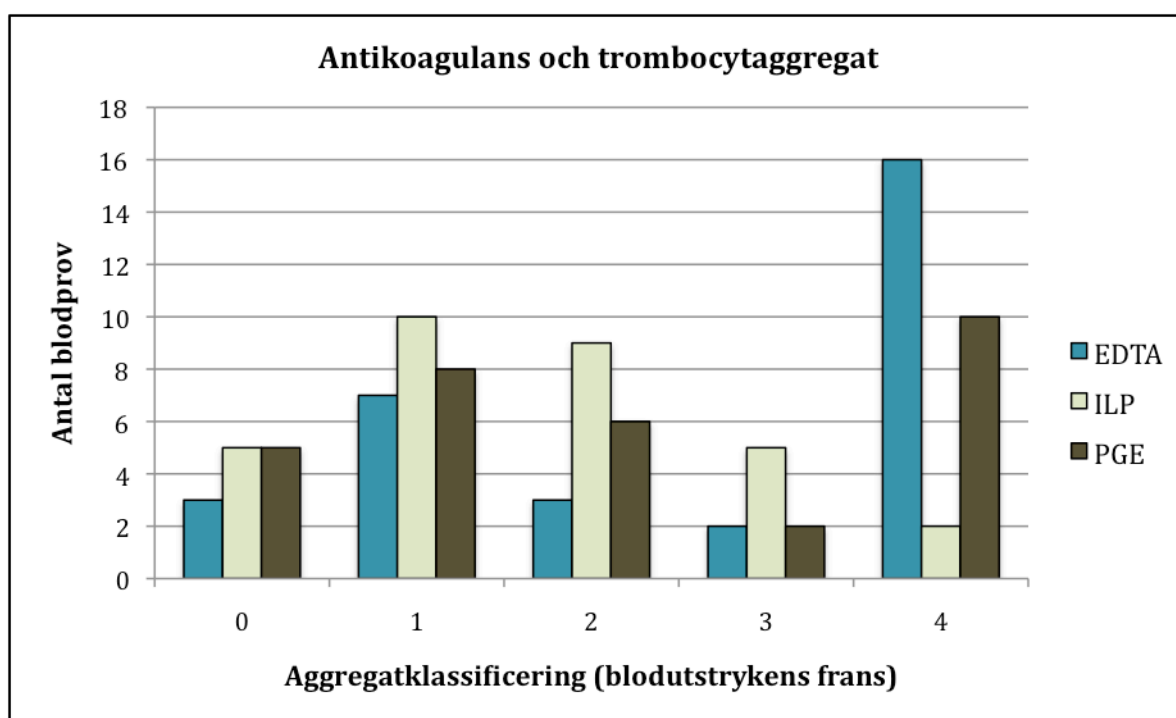
Sammanlagt provtogs 43 katter, varav 35 blodprov analyserades för studien. Exkluderade prover valdes bort på grund av mycket långsamt blodflöde eller alldeles för liten blodvolym i provröret. I de fall man bara fick ut omkring 1,5 ml blod fördelades blodet mellan två av tre antikoagulantia. Advia och blodutstryk gjordes på samtliga prover. På grund av begränsad tillgång till BMA fick man på en katts blod bortprioritera manuell räknekammare. Vid analys med QBC gick ett hematokritrör med ILP sönder och i ett annat fall erhöles, på grund av tekniska fel, inget värde alls på PGE. QBC-resultaten kunde ofta flagga för att trombocyträkningen inte var korrekt, i dessa fall kördes proven om tills dess att instrumentet visade att slutlig trombocyträkning var fastställd (“=”). QBC-resultat utan fastställd PLT användes inte vid de statistiska beräkningarna. För översikt av antal erhållna blodprovresultat, se tabell 4.

Tabell 4. Sammanställning av analyserade prover (antal)

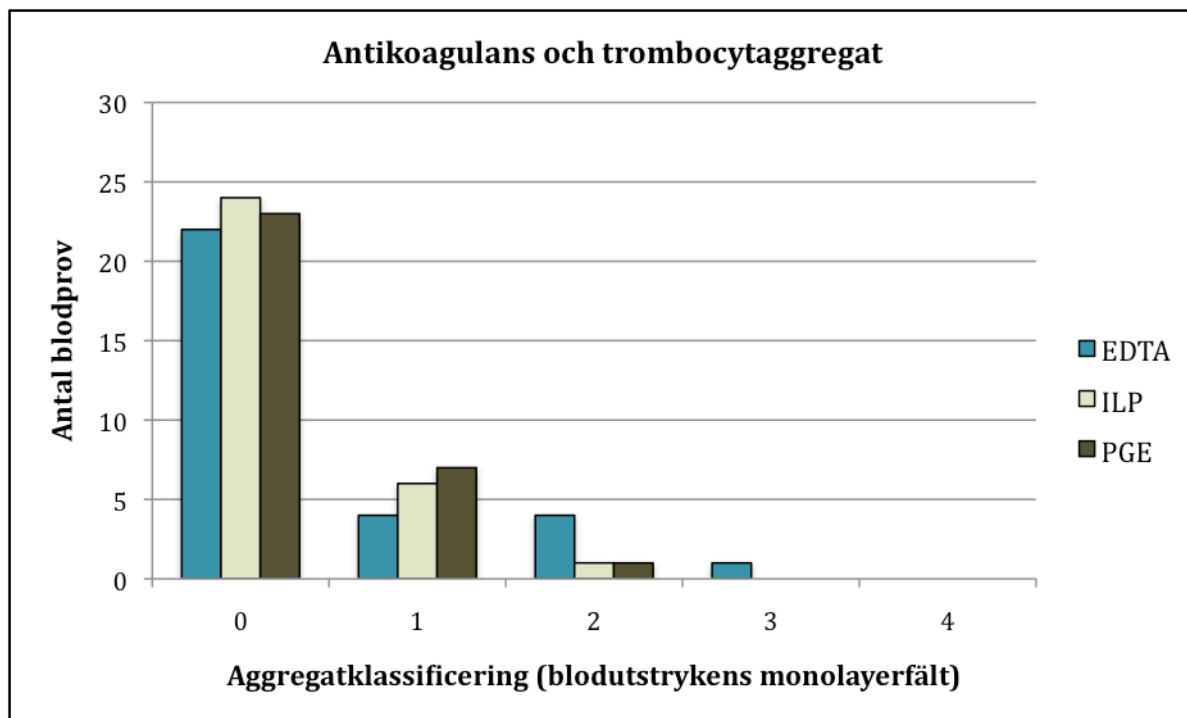
Antikoagulans	Metod				
	Advia	Blodutstryk	Räknekammare	QBC	QBC “=”
EDTA	34	34	33	34	30
EDTA + PGE	32	32	31	31	27
EDTA + ILP	35	35	34	34	32

Antikoagulans inverkan på trombocyttaggregering

Enligt blodutstryken hade EDTA-blod utan annan tillsats (EDTA) högre förekomst av många och stora trombocyttaggregat än både EDTA-blod med tillsats av prostaglandin E1 (PGE) och EDTA-blod med tillsats av iloprost (ILP) (Figur 4a). EDTA hade även flest blodprover med aggregatklassificering 2 i monolayerområdet och var här den enda med ett blodprov som hade aggregatklassificering 3 (Figur 4b). Lägst förekomst av aggregatklassificering 4 i fransen och högst frekvens av aggregatklassificering 0 i monolayer hade ILP. Inget antikoagulans lyckades förhindra trombocyttaggregering helt och hållet.



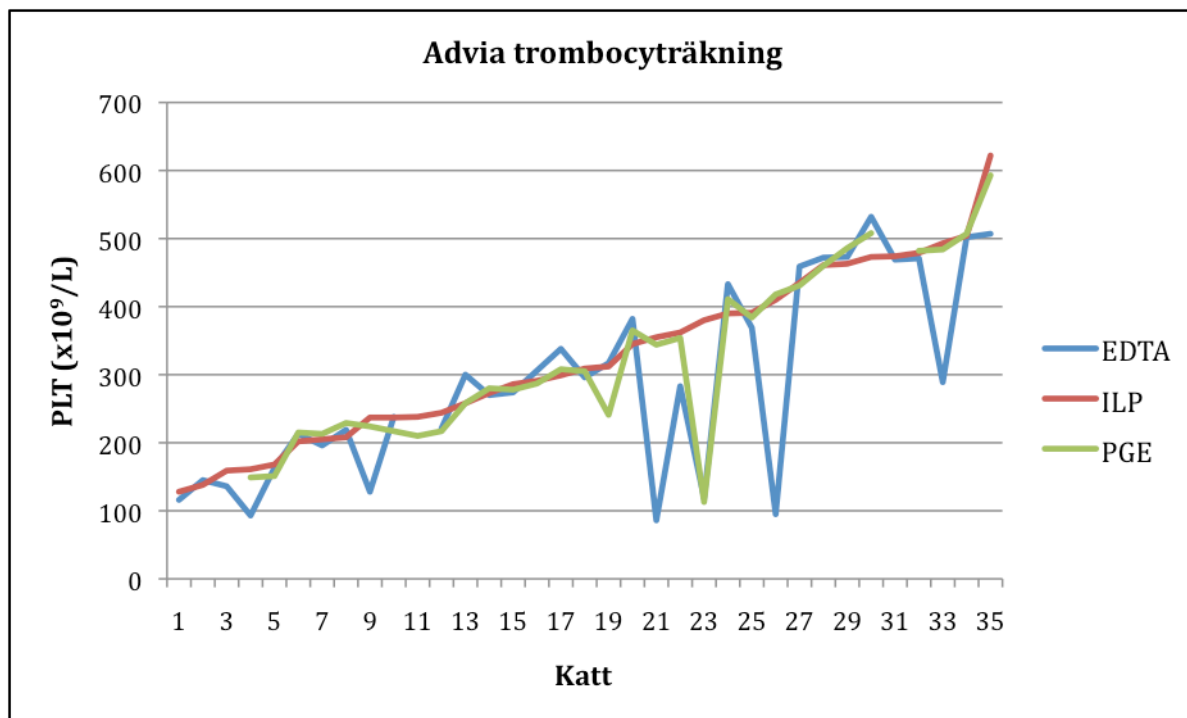
Figur 4a. Förekomst av trombocyttaggregat på blodutstrykens frans hos katter där samtliga tre antikoagulans användes. $N = 31$.



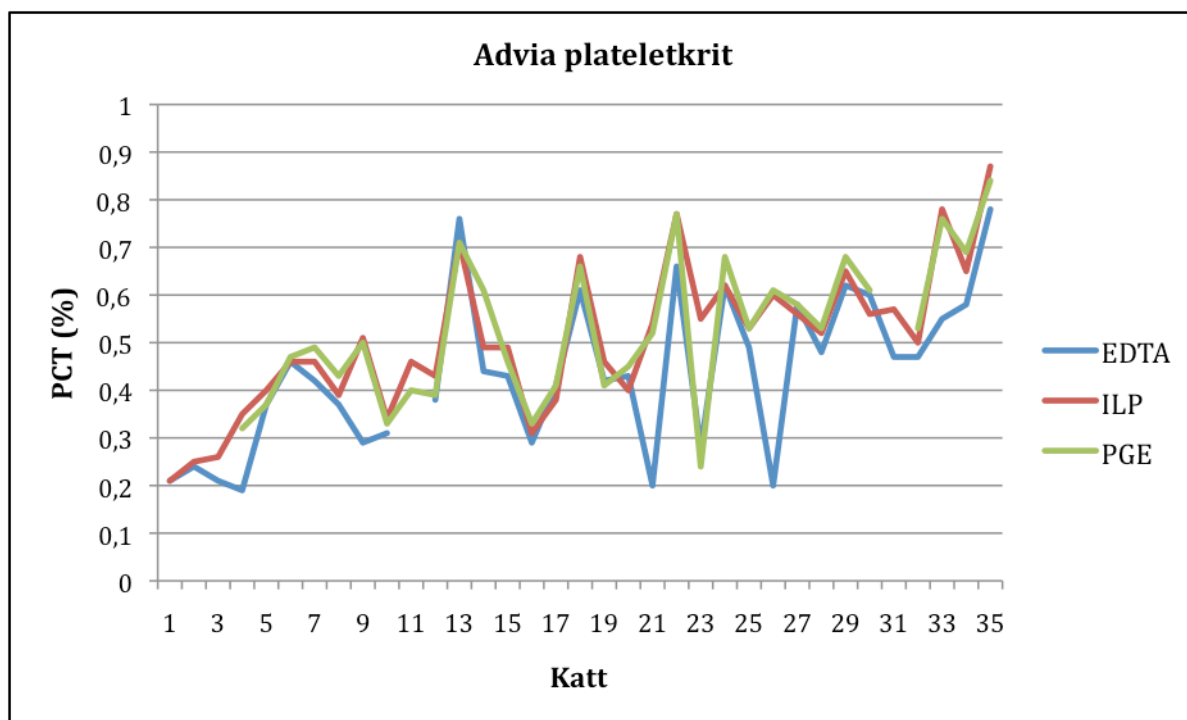
Figur 4b. Förekomst av trombocyttaggregat i blodutstrykens monolayerområde hos katter där samtliga tre antikoagulans användes. N = 31.

Advia trombocyträkning och Advia plateletkrit

Trombocyträkning med Advia visade att åtta katters blodprov redovisade tydligt lägre trombocyträkning (PLT) när EDTA användes jämfört med ILP (Figur 5a). Differensen mellan PLT ILP och PLT EDTA var i dessa fall mellan $68\text{--}315 \times 10^9/\text{L}$. Skillnad mellan PLT ILP och PLT EDTA användes som ett sätt att mäta storleken av trombocyträkningsfel orsakat av aggregat. I två fall hade PGE markant lägre PLT än ILP, $71 \times 10^9/\text{L}$ respektive $267 \times 10^9/\text{L}$. I det senare fallet var orsaken sannolikt att prostaglandinröret hade värmeinaktiverats under felhantering. I figur 5b presenteras blodprovets PCT i samma ordning som figur 5a och man kan se att PCT inte alltid följer PLT. Hos sex katter var PCT EDTA tydligt lägre än PCT ILP. I ett fall var PCT PGE tydligt lägre än PCT ILP.

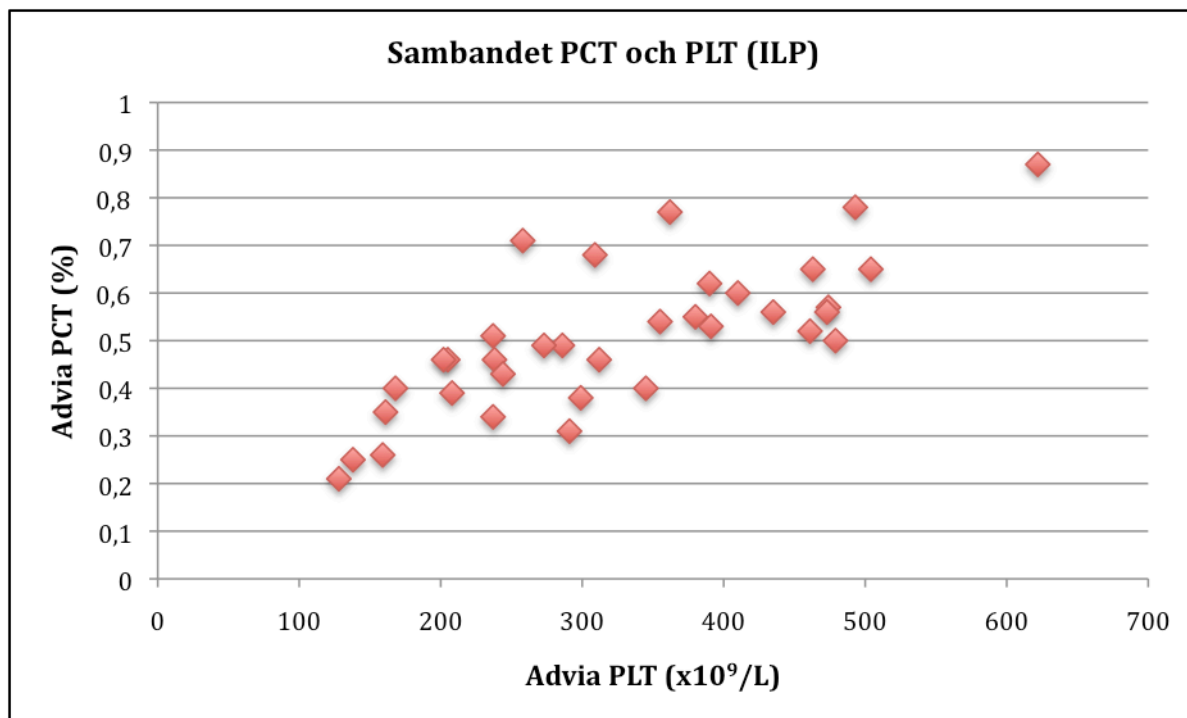


Figur 5a. Trombocyträkningsresultat från Advia. Samtliga prover redovisas. N EDTA = 34, n PGE = 32, n ILP = 35. Katterna är arrangerade från lägsta till högsta PLT ILP.



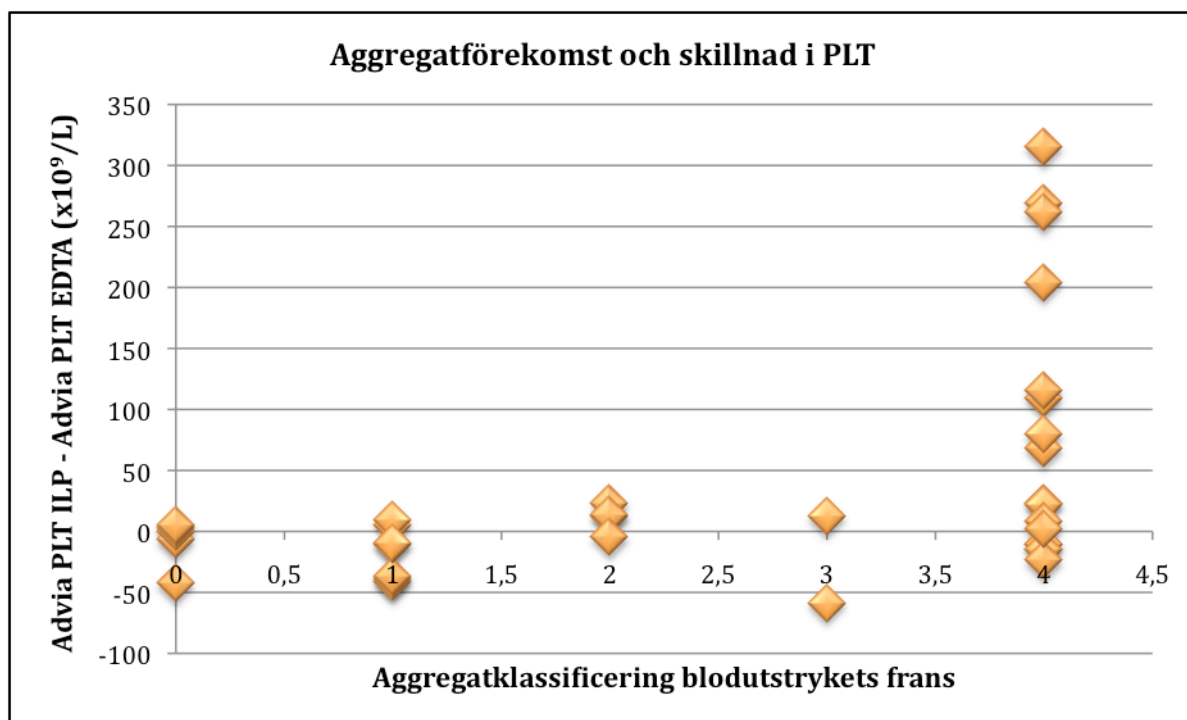
Figur 5b. Plateletkritresultat från Advia. Samma prover som i Figur 5a redovisas, i stigande ordning från lägsta till högsta Advia PLT ILP.

Korrelationskoefficienten (r) mellan PCT ILP och PLT ILP var 0,75, korrelationen (r^2) 0,57 (Figur 6).



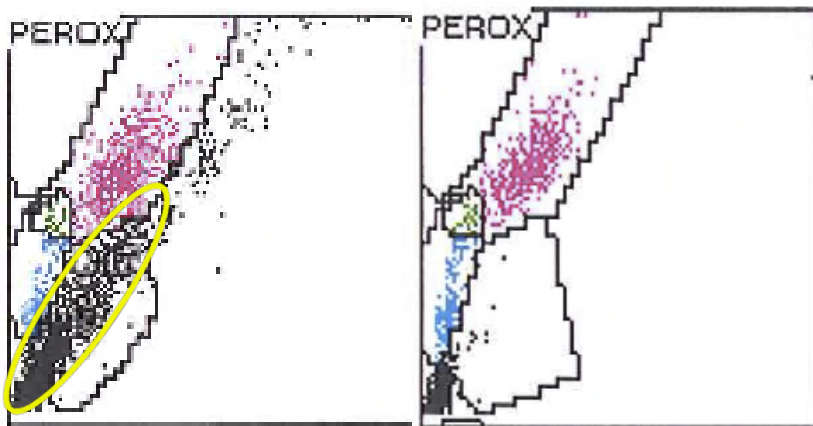
Figur 6. Graden av linjärt samband mellan Advia PCT och Advia PLT. $N = 35$.

När skillnaden i trombocyträkning med ILP jämfört med EDTA var tydlig ($> 60 \times 10^9/L$), hade EDTA-blodet enligt blodutstrykens frans många och stora aggregat (Figur 7). I de fall PLT EDTA var högre än PLT ILP (negativt värde på y-axeln), var skillnaden i trombocyträkning inte lika stor och det fanns heller inget fall som kunde relateras till att ILP-blodet hade högsta aggregatklassificering (samband ej redovisat i diagramform).



Figur 7. Sambandet mellan stor skillnad i PLT ILP och PLT EDTA och hög aggregatklassificering enligt blodutstrykets frans på EDTA-blod. $N = 34$.

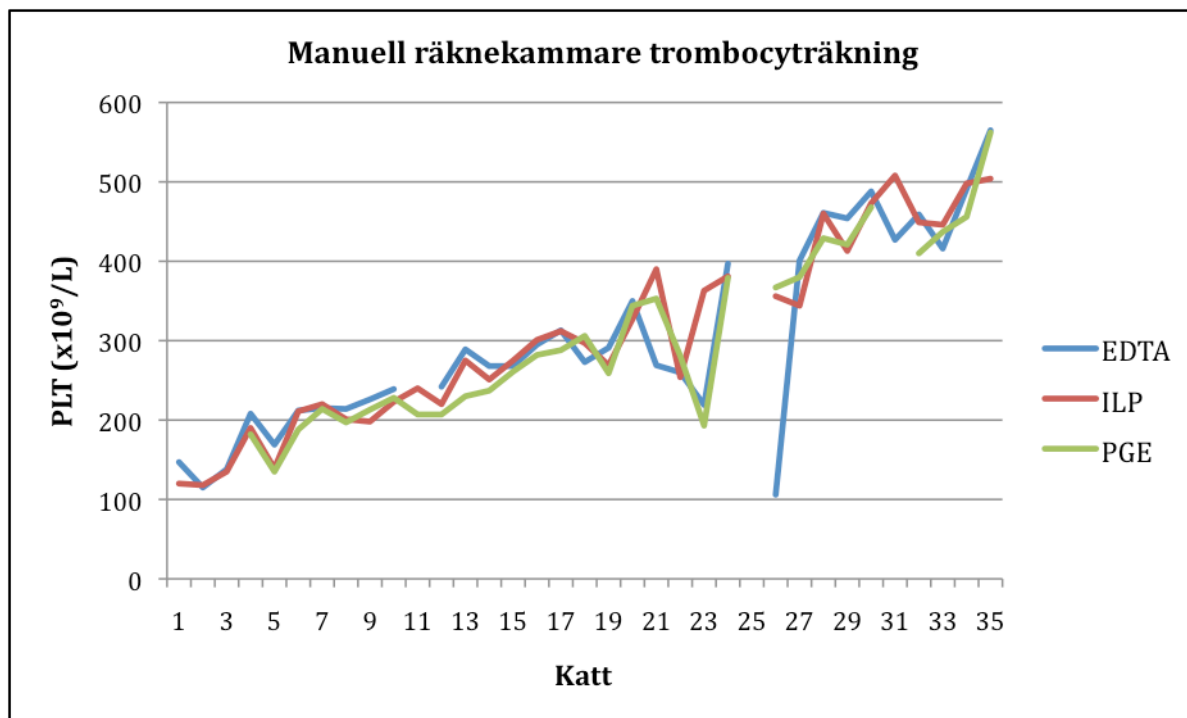
Figur 8a och 8b visar två peroxidas leukocytytogram från Advia 2120. Analyserna är gjorda på en och samma katts blod, provtaget vid ett tillfälle men med olika antikoagulans. Prickarna med olika färger motsvarar instrumentets registreringar av olika celltyper, varav de svarta prickarna utgåendes från det nedre vänstra hörnet representerar trombocyter och trombocytaggregat. De svarta prickarna högre upp på y-axeln är aggregat.



Figur 8a (vänster) och figur 8b (höger). Peroxidascytogram från Advia 2120 som återger skillnad i mängden trombocytaggregat. Blodet som har analyserats är taget från en och samma katt vid ett tillfälle men med olika antikoagulans. Cellstorlek är på y-axeln och peroxidasfärg på x-axeln. Figur 8a (vänster) visar resultatet från blod taget med EDTA utan annan tillsats. I detta prov finns det stora mängder trombocytaggregat (svarta prickar innanför en gul oval markering). Figur 8b (höger) visar resultatet från blod med tillsats av iloprost. Mängden aggregat var betydligt färre.

Manuell räknekammare och trombocyträkning

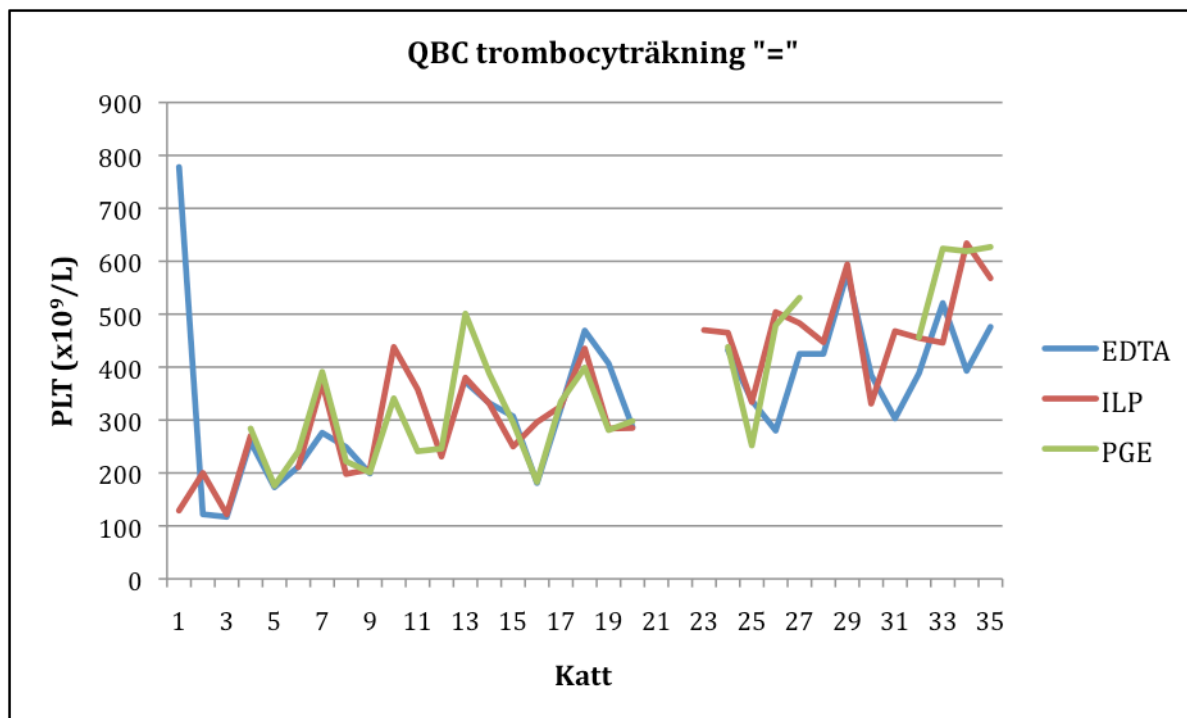
PLT med manuell räknekammare redovisade mindre variation i trombocyträkningsresultat mellan olika antikoagulans än trombocyträkningen med Advia eller QBC (Figur 9). Fyra prover visade på tydligt lägre PLT med EDTA än ILP (differens $81\text{--}250 \times 10^9/\text{L}$).



Figur 9. PLT med manuell räknekammare. $N_{EDTA} = 33$, $n_{PGE} = 31$, $n_{ILP} = 34$. På en av de 35 katternas blodprov gjordes ingen manuell räkning på någon av substanserna. Katterna arrangerade efter lägsta till högsta Advia PLT ILP.

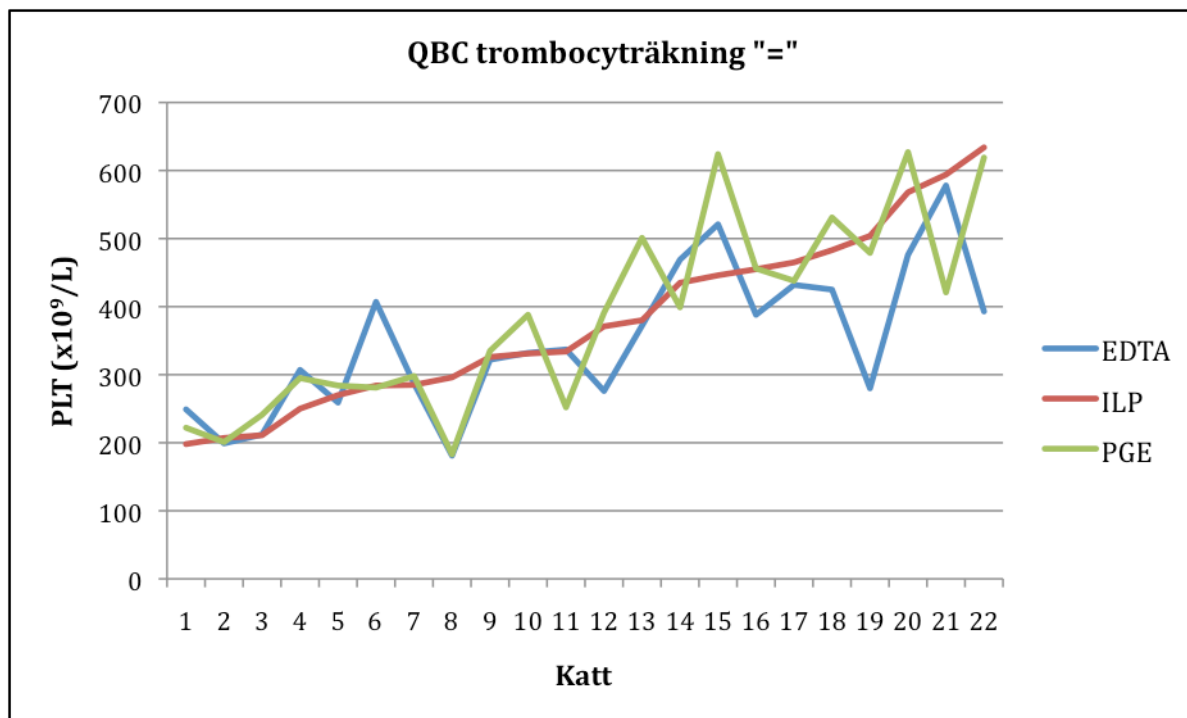
QBC VetAutoread och trombocyträkning

QBC VetAutoread flaggade ofta. Ibland var det även tekniska problem med instrumentet. Dessa faktorer medförde att ett och samma blodprov ofta fick köras flera gånger, med målsättning att instrumentet skulle visa att det hade fastställt blodprovets trombocytvärde (“=”). Antalet katter som man erhöll slutgiltig QBC PLT hos varierade per antikoagulant (Figur 10, Tabell 4).

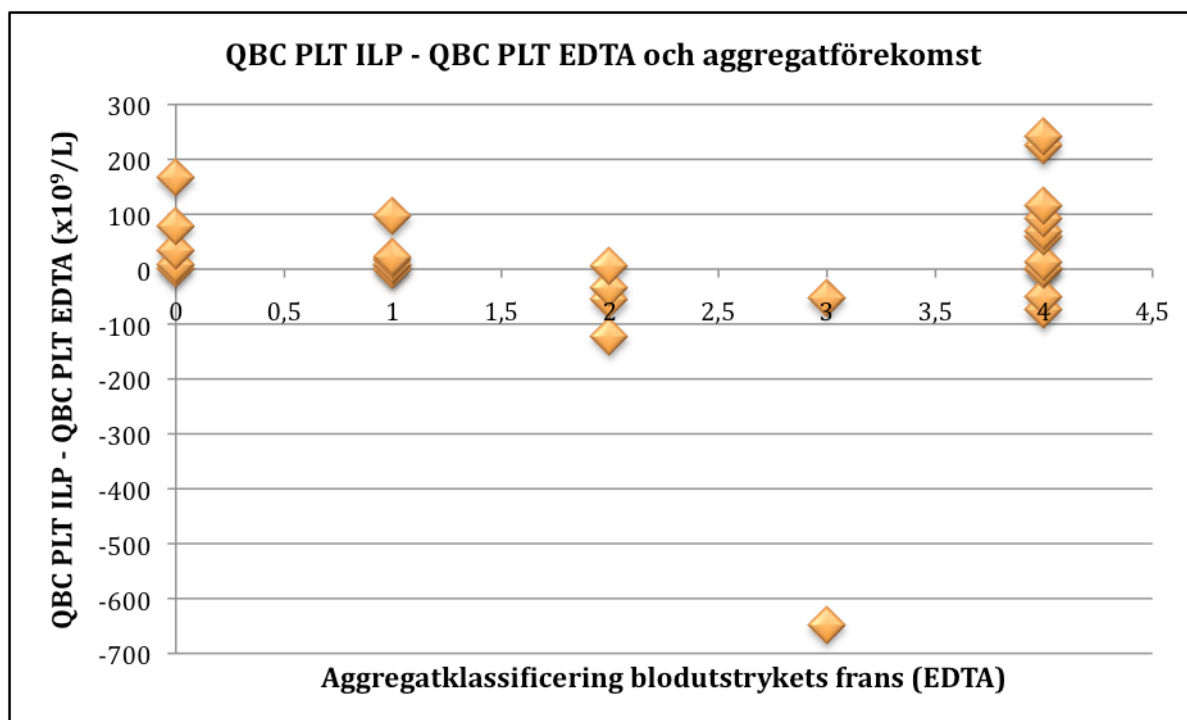


Figur 10. PLT med QBC VetAutoread. Endast katter med slutgiltig PLT ("=") redovisas. Katterna är arrangerade från lägsta till högsta Advia PLT ILP.

Slutgiltig trombocyträkning ("=") på samtliga tre antikoagulan när instrumentet inte flaggade ("---", "#" eller ">") eller hade tekniska fel, erhöles i 22 av 35 fall. För övriga 13 katter saknades antingen en slutgiltig trombocyträkning, eller så räckte inte blodet till både EDTA, PGE och ILP. PLT-räkningen varierade mer mellan de olika substanserna vid analys av QBC än med Advia och manuell räknekammare (Figur 11a). Skillnad i trombocyträkning mellan ILP och EDTA kunde inte förklaras med att EDTA-blodet hade ökat antal trombocyttaggregat (Figur 11b).



Figur 11a presenterar trombocyträkningen hos 22 av 35 katter där slutgiltig trombocyträkning med alla tre antikoagulans erhöles. Katterna är ordnade från lägsta till högsta PLT ILP.

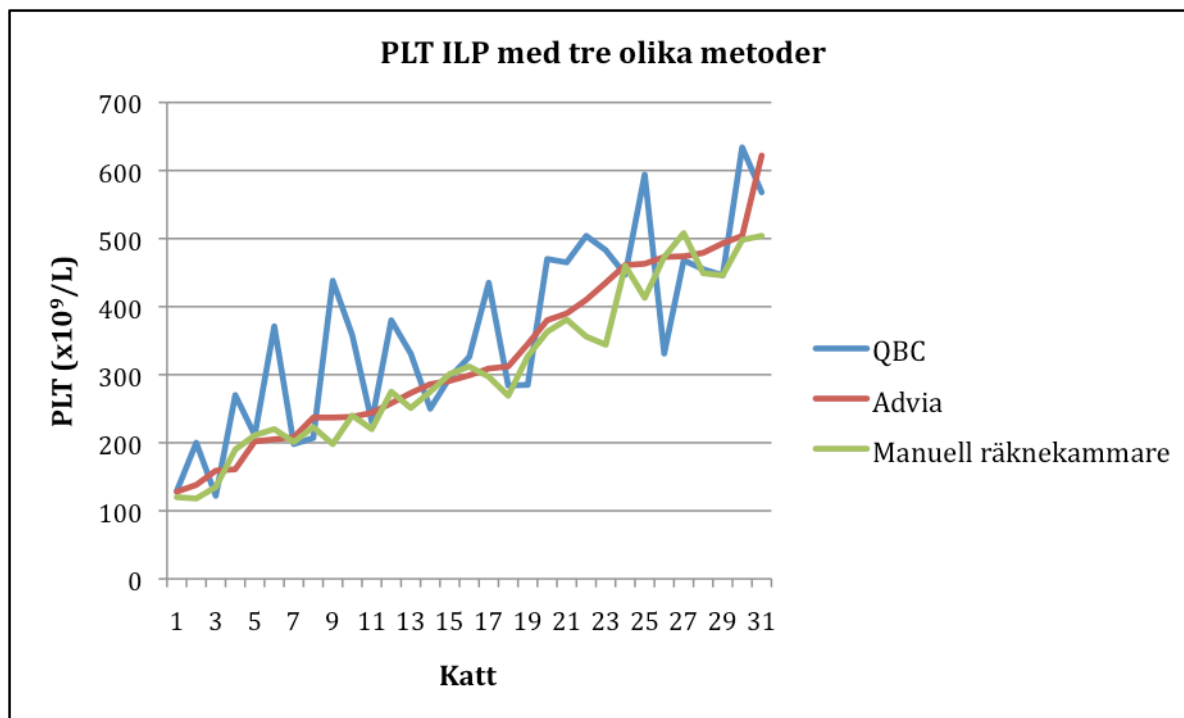


Figur 11b visar förhållandet mellan skillnad i trombocyträkning mellan ILP och EDTA och blodprovskvaliteten hos EDTA enligt blodutstrykets frans. Endast katter med slutgiltig trombocyträkning med ILP och EDTA redovisas. $N = 28$.

Metodjämförelse

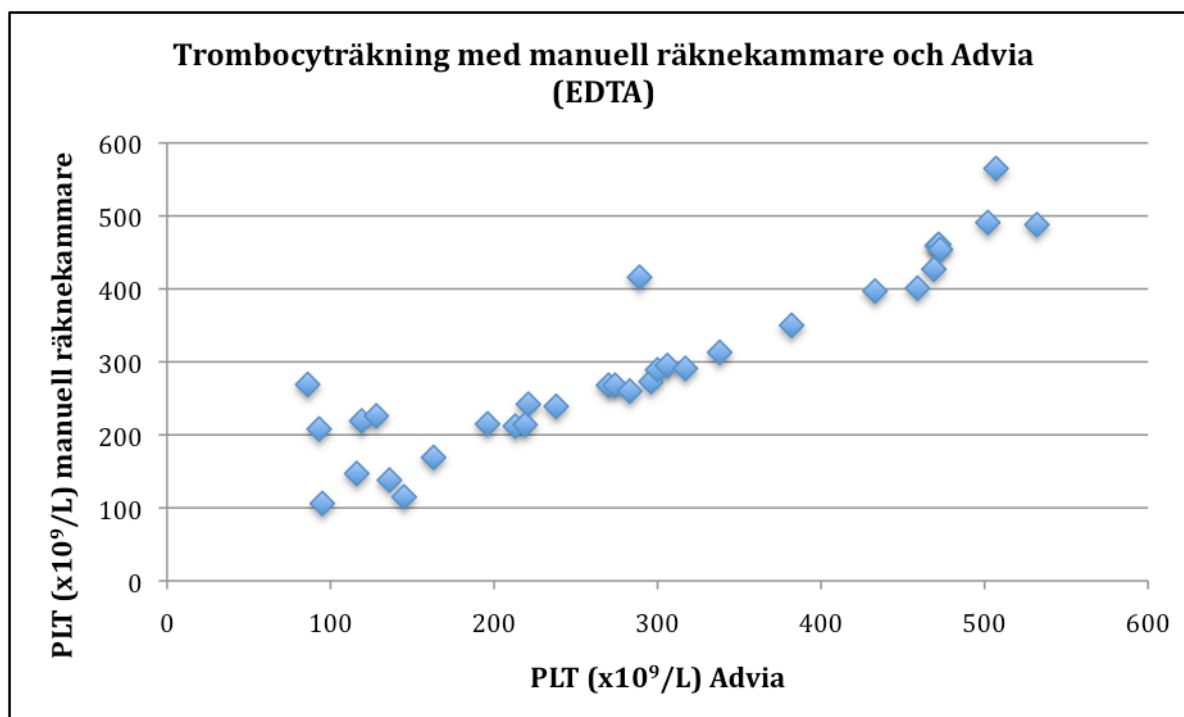
Jämförelse av trombocyträkning (PLT) på EDTA-blod med tillsats av iloprost med QBC, Advia och manuell räknekammare visade på högst korrelationskoefficient mellan Advia och manuell räknekammare (0,97) (Figur 12). Graden av linjärt samband mellan QBC och Advia

var 0,82, och mellan QBC och manuell räknekammare 0,80. QBC PLT var ofta högre än PLT med Advia och manuell räknekammare.

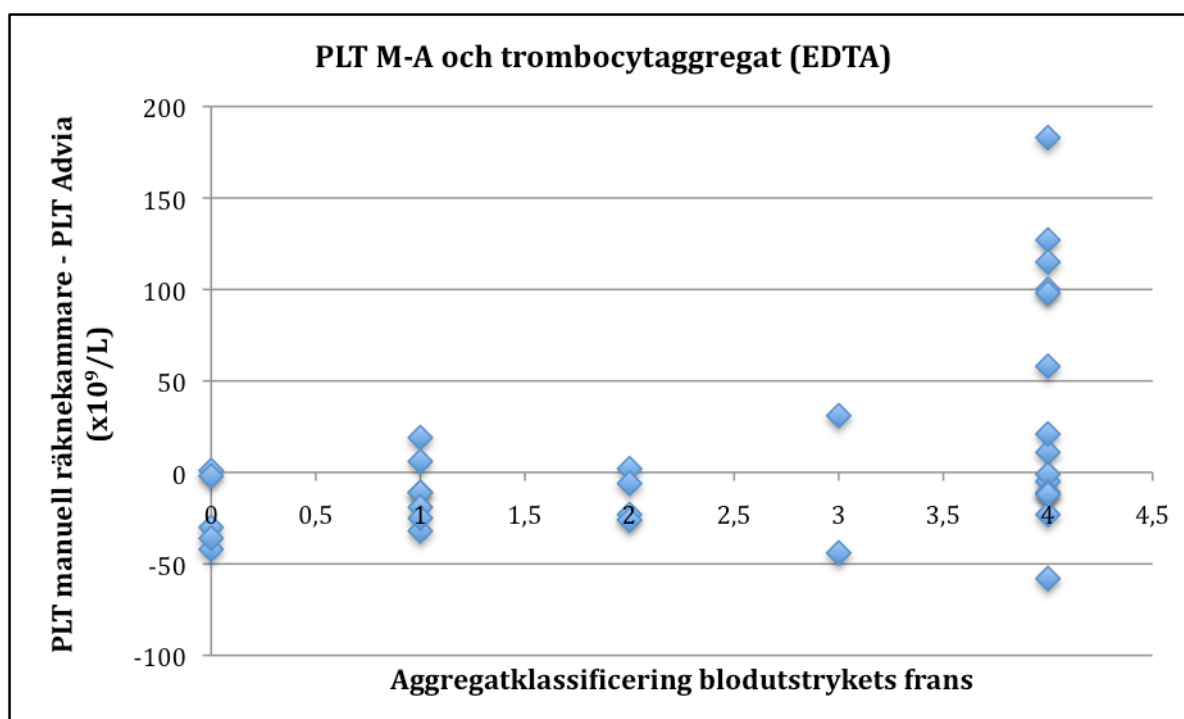


Figur 12. ILP-blod analyserat med QBC, Advia och manuell räknekammare. Endast de QBC-resultat när instrumentet har gett en slutgiltig (“=”) trombocyträkning redovisas. I ett fall genomfördes inte manuell räknekammare. N = 31.

Korrelationskoefficienten (r) mellan manuell räknekammare och Advia vid trombocyträkning med EDTA-blod var 0,92 (Figur 13a). Antalet katter som redovisas är 33 av 35. Vid ett tillfälle genomfördes inte manuell räknekammare. För en annan katt kunde EDTA, på grund av otillräcklig blodvolym i provröret, inte analyseras över huvud taget. I 20 av 33 fall presenterade Advia PLT (A) högre än PLT med manuell räknekammare (M) (negativ M-A) (Figur 13b). I resterande fall presenterade manuell räknekammare högre PLT än Advia (positiv M-A). I samtliga fall då manuell räknekammare redovisade $> 50 \times 10^9/L$ högre än Advia hade blodet aggregatklassificering 4. Variansvidden högsta negativa M-A till högsta positiva M-A var 241.



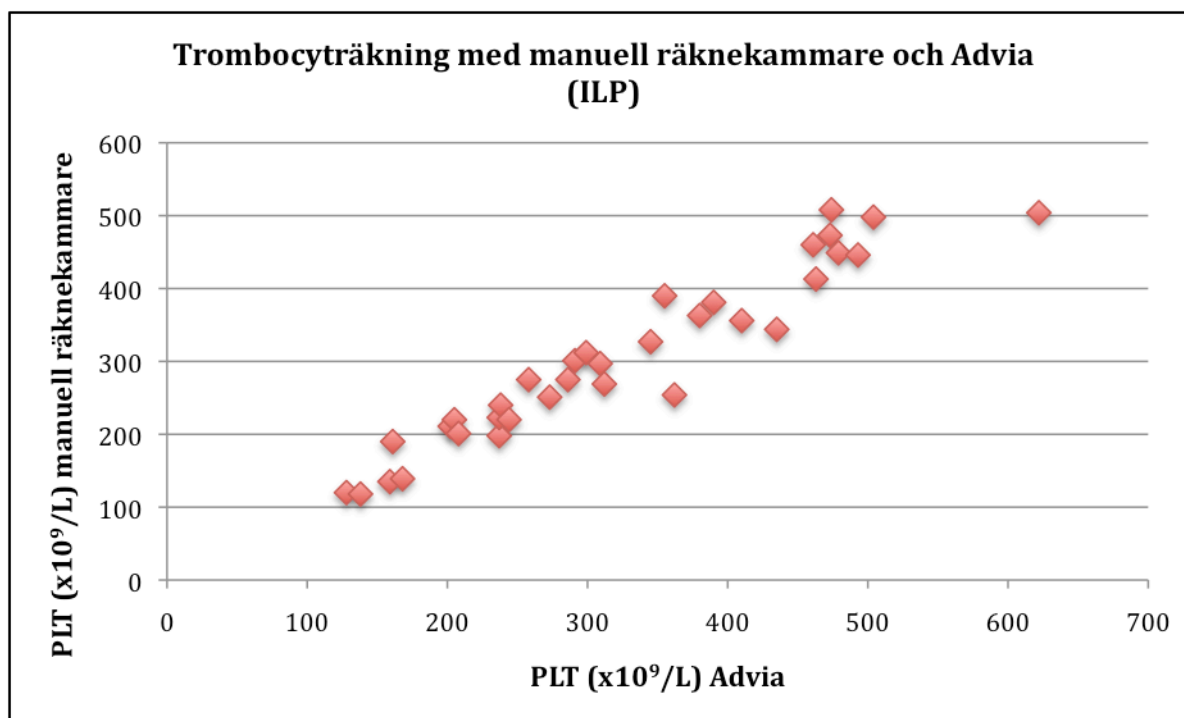
Figur 13a. Grad av överensstämmelse vid trombocyträkning på EDTA-blod mellan manuell räknekammare och Advia. N = 33.



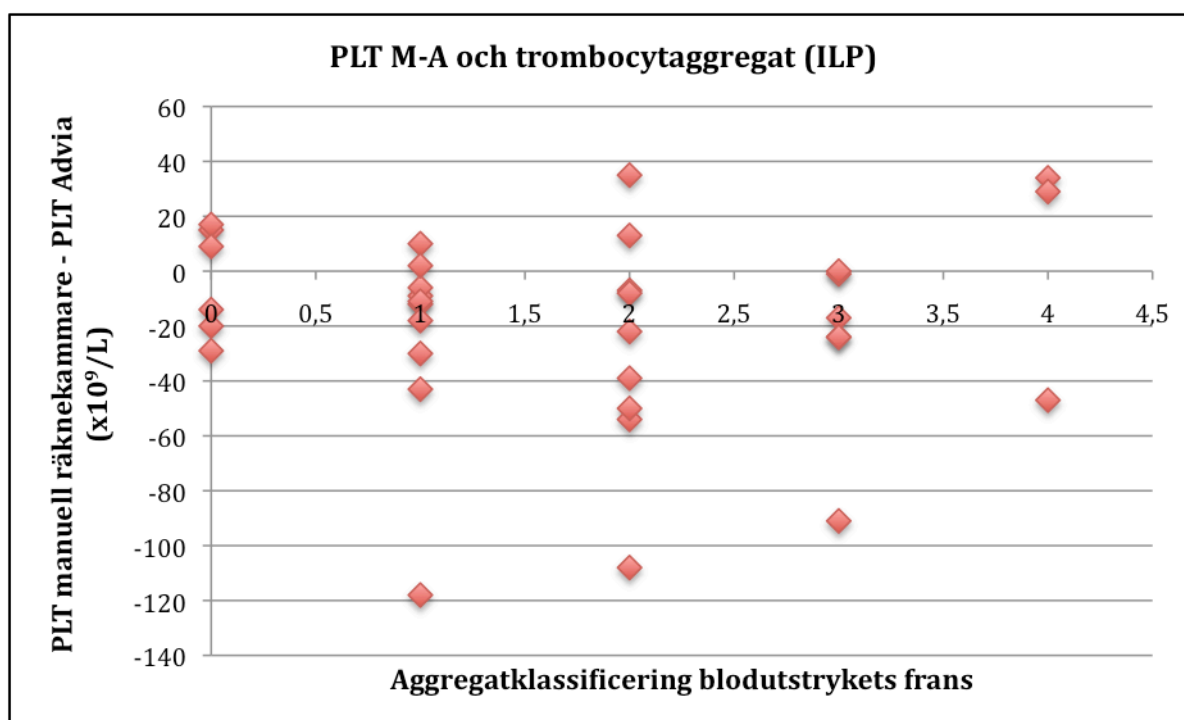
Figur 13b. Sambandet mellan högre PLT vid räkning på EDTA-blod med manuell räknekammare och förekomst av trombocytaggregat. M = manuell räknekammare, A = Advia. N = 33.

Korrelationskoefficienten (r) mellan manuell räknekammare och Advia vid trombocyträkning med ILP-blod var 0,96 (Figur 14a). Antalet katter som redovisas är 34 av 35. Vid ett tillfälle genomfördes inte manuell räknekammare. I 24 av 34 fall presenterade Advia PLT (A) högre än PLT med manuell räknekammare (M) (negativ M-A) (Figur 14b). I nio fall presenterade manuell räknekammare högre PLT än Advia (positiv M-A) och i ett fall blev

trombocyträkningen lika hög ($y = 0$). Variansvidden högsta negativa M-A till högsta positiva M-A var 153. Spridningen i M-A var lägre för ILP än för EDTA (Figur 14b och 13b). Med ILP förekom även färre prover med trombocytaggregat klassificering 4.

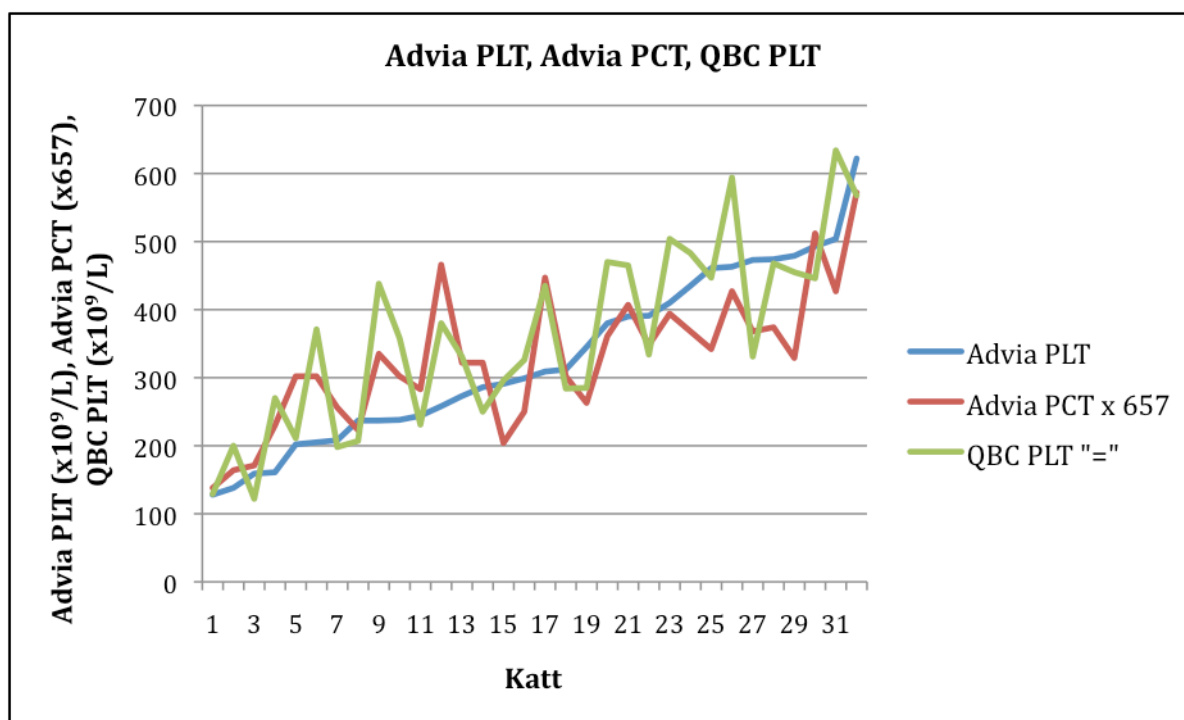


Figur 14a. Grad av överensstämmelse vid trombocyträkning på ILP-blod mellan manuell räknekammare och Advia. $N = 34$.



Figur 14b. Sambandet mellan högre PLT vid räkning på ILP-blod med manuell räknekammare och förekomst av trombocytaggregat. M = manuell räknekammare, A = Advia.

QBC mäter PCT direkt, men rapporterar ut i PLT. För att kunna redovisa Advia PCT i samma figur som QBC PLT och Advia PLT har Advia PCT multiplicerats med en faktor 657. Faktor 657 bestämdes utifrån medelvärde på Advia PLT ILP/medelvärde på Advia PCT ILP ($n = 32$). Korrelationskoefficienten mellan både Advia PCT $\times 657$ och QBC PLT "=" samt Advia PLT och QBC PLT "=" var endast 0,81 (Figur 15). Sambandet Advia PCT Advia PLT var också lågt (jämför Figur 6).



Figur 15. Sambandet mellan Advia PLT ILP, Advia PCT $\times 657$ ILP och QBC PLT ILP. $N = 32$.

Korrelationskoefficienten (r) mellan EDTA, PGE och ILP från Advia, manuell räknekammare och QBC visar att QBC resulterade i störst skillnad i PLT mellan de olika substanserna, medan manuell räknekammare presenterade minst skillnad (Tabell 5a). Korrelationen var högst och hade minst variation i prover med ILP eller PGE som hade analyserats med Advia eller manuell räknekammare. Antalet katter som redovisas per metod varierar. Hos fyra av de 35 katterna räckte inte blodet till samtliga substanser. Katten vars rör med prostaglandin E1 hade felförvarats har exkluderats för att inte medföra negativ bias. I ett fall hade man inte möjlighet att genomföra manuell räknekammare. QBC-resultaten är de fall där samtliga antikoagulan användes och gav ett slutgiltigt "=" trombocytvärde. I tabell 5b redovisas samma katters standardavvikelse med de olika substanserna och metoderna.

Tabell 5a. Graden av linjärt samband mellan EDTA, PGE och ILP inom tre olika räkningsmetoder

Variabler	Korrelationskoefficient (r)		
	Advia	Manuell räknekammare	QBC
EDTA och PGE	0,78	0,87	0,71
EDTA och ILP	0,76	0,87	0,74
PGE och ILP	0,99	0,98	0,85
Antal (n)	30	29	22

Tabell 5b. Standardavvikelse hos EDTA, PGE och ILP med tre olika metoder

Antikoagulans	Standardavvikelse (SD)		
	Advia	Manuell räknekammare	QBC
EDTA	135	116	106
PGE	123	110	138
ILP	121	109	128
Antal (n)	30	29	22

Medelvärde, median och standardavvikelse för de katter där en slutgiltig trombocyträkning erhöles för samtliga substanser och samtliga metoder redovisas i tabell 6 (n = 21). Genomsnittlig PLT var liknande för Advia och manuell räknekammare (316-342). Högsta genomsnittliga trombocyträkning med Advia erhöles med ILP. Advia PGE PLT hade dock ett snarlikt medelvärde. Med Advia PCT och QBC PLT medförde PGE de högsta genomsnittliga resultaten. QBC PLT PGE redovisade högst PLT av samtliga antikoagulans och trombocyträkningsmetoder. Genomsnittligt resultat från manuell räknekammare tydde på att olika antikoagulans inte medför någon egentlig skillnad i PLT (316-321). Lägst genomsnittlig standardavvikelse återfanns med manuell räknekammare.

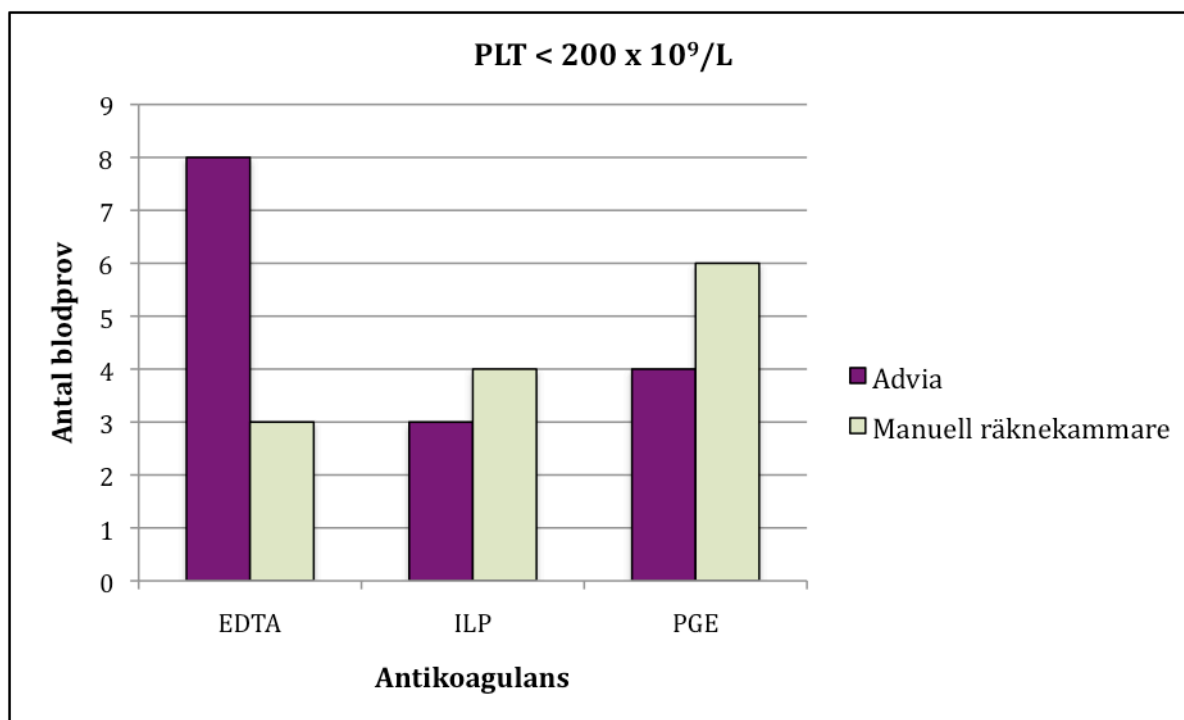
Tabell 6. Medelvärde (medel), median (Md), standardavvikelse (SD) för Advia PCT, Advia PLT, manuell räknekammare PLT, QBC PLT med EDTA, PGE och ILP. PLT x 10⁹/L. PCT anges i %. N = 21

Metod	EDTA			PGE			ILP		
	Medel	Md	SD	Medel	Md	SD	Medel	Md	SD
Advia PCT	0,47	0,44	0,16	0,55	0,53	0,15	0,53	0,49	0,15
Advia PLT	318	300	123	341	305	122	342	309	122
Räknekammare	320	291	114	316	288	104	321	301	97
QBC	351	332	109	391	391	139	381	371	131

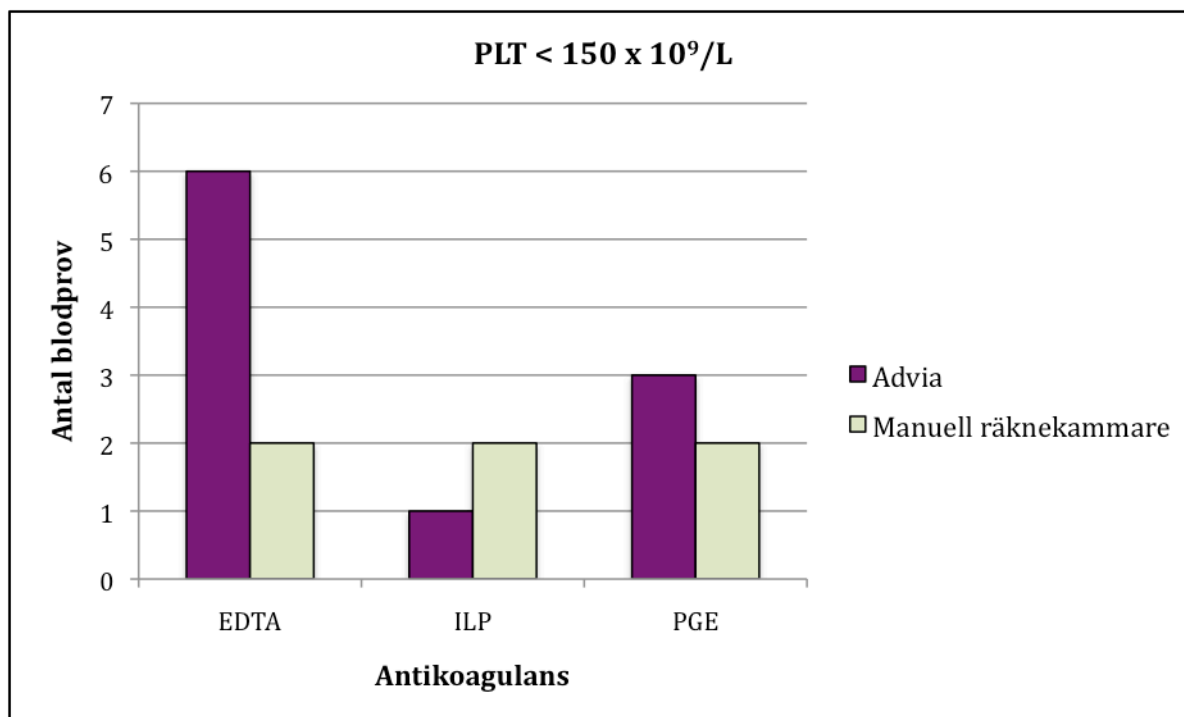
Antal katter med sann trombocytopeni

Fyra av de 35 katterna hade troligtvis sann, men lindrig, trombocytopeni. Antalet katter med PLT < 200 x 10⁹/L och < 150 x 10⁹/L var fler med Advia EDTA än med Advia ILP och Advia PGE (Figur 16a, Figur 16b). Med Advia hade PGE ett fall mer med PLT < 200 x 10⁹/L än ILP

(Figur 16a). Detta berodde sannolikt på att PGE hade felförvarats och att det fanns aggregat i provet. Manuell räknekammare PGE redovisade tre fler fall med $PLT < 200 \times 10^9/L$ än manuell räknekammare EDTA. Motsvarande antal fall för manuell räknekammare ILP var ett. De katter som redovisas i figur 16a och 16b är de katter där samtliga tre antikoagulans har använts ($n = 30$).

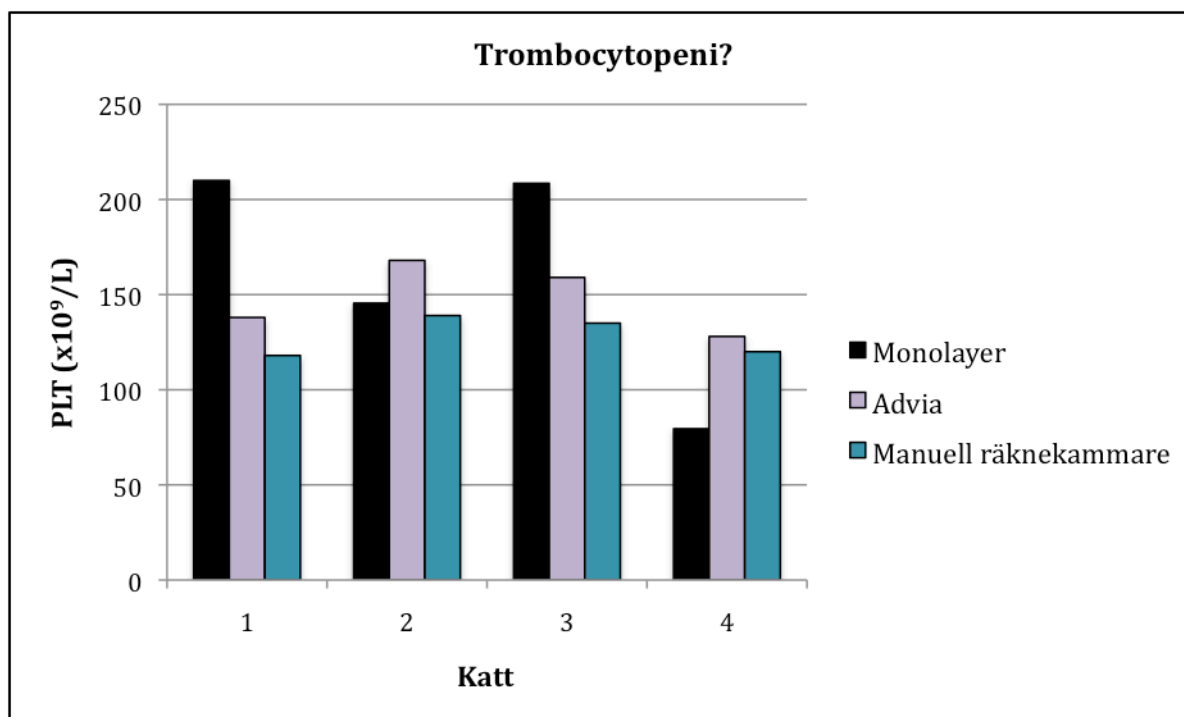


Figur 16a. Antalet katter med en trombocyträkning $< 200 \times 10^9/L$, sett till tre olika antikoagulans och två olika räkningsmetoder. $N = 30$.



Figur 16b. Antalet katter med en trombocyträkning $< 150 \times 10^9/L$, sett till tre olika antikoagulans och två olika räkningsmetoder. $N = 30$.

Fyra av samtliga provtagna katter (n =35) hade $PLT < 200 \times 10^9/L$ med både Advia och manuell räknekammare. Trombocyträkning i monolayer visade att två av de fyra katterna även hade $PLT < 200 \times 10^9/L$ med räkning på blodutstryk (Figur 17). Ingen av de fyra katterna hade enligt blodutstrykets frans aggregatklassificering 4. Hos tre av katterna lyckades iloprost lite, men än dock något, höja PLT. Hos den fjärde katten (nummer 1) visade PLT EDTA högre än PLT ILP, men denna katt hade aggregatklassificering 0. Två av de fyra katterna (katt 2 och katt 4) hade enligt samtliga tre metoder trombocytopeni. Katt 1 och katt 3 hade däremot enligt blodutstryken PLT strax över $200 \times 10^9/L$. Med Advia räknas dock fler celler och precisionen bör vara högre. Blodet från både katt 1 och katt 3 var av god analyskvalitet, och låg optisk trombocyträkning bör därför inte ha orsakats av trombocytaggregat. Advia kan dock ge falskt låg trombocyträkning om trombocyterna är > 60 fl stora. Lindrig trombocytopeni kunde därför inte uteslutas hos katt 1 och katt 3.



Figur 17. Trombocyträkning i monolayer hos fyra katter vars PLT_{ILP} var $< 200 \times 10^9/L$ med både Advia och manuell räknekammare.

DISKUSSION

Inom klinisk diagnostik har det hos katter alltid varit ett stort problem att få en sann trombocyträkning (TPK, PLT). Viktig ny information presenteras i vår studie. En lätt och billig metod för att undvika trombocytaggregat är att använda iloprost som tillsats i blodprovrröret. Tolkningen är att den metod som gav högre PCT och högre PLT är den metod som fungerar bäst mot pseudotrombocytopeni. Tillsats av iloprost, 40-80 ng, till blod taget med EDTA-rör minskade bildningen av trombocytaggregat och höjde PLT och PCT. Genomsnittlig PLT i blod med tillsats av iloprost analyserat med Advia var $328 \times 10^9/L$ (n = 34). Motsvarande siffra för EDTA var $291 \times 10^9/L$. Detta innebär att iloprost i genomsnitt

höjde trombocyträknningen med $37 \times 10^9/L$. I enstaka fall höjdes trombocyträknningen med upp till $315 \times 10^9/L$. Man kunde påvisa ett tydligt samband mellan stor skillnad i PLT och att EDTA-blod utan annan tillsats hade många och stora trombocytaggregat. Vid jämförelse av ILP och PGE sågs liten skillnad. ILP hade en genomsnittlig trombocyträkning med $330 \times 10^9/L$ och PGE $328 \times 10^9/L$ ($n = 31$). Om man inkluderar det PGE-prov som sannolikt hade inaktiverats, skulle genomsnittlig PLT PGE i stället ha varit $321 \times 10^9/L$ och PLT ILP $332 \times 10^9/L$ ($n = 32$). Sett till Advia PCT var trenden ungefär densamma som med Advia PLT. Genomsnittlig PCT EDTA var 0,45 medan den för ILP var 0,52 och för PGE 0,53 ($n = 30$).

Denna studie stödjer de resultat som nyligen presenterades på kongressen "International Society for Animal Clinical Pathology" i Ljubljana, juli 2012. Riond *et al.* (2012a) fann att iloprost 20 ng och 200 ng hade mycket god effekt mot trombocytaggregering. Här aspirerade man blod från vena jugularis och förde över det till EDTA-rör förpreparerade med iloprost. Genomsnittlig trombocyträkning i blod överfört till EDTA-rör utan annan tillsats var $105 \times 10^9/L$, medan den för EDTA med iloprosttillsats var $213 \times 10^9/L$ ($n = 20$). Med EDTA hade 50% av katterna pseudotrombocytopeni (definition för trombocytopeni dock ej angiven).

Med en definition på trombocytopeni som $< 200 \times 10^9/L$ skulle 29% (tio av 34) av katterna i vår studie ha haft trombocytopeni, sett till Advia-resultat på EDTA utan annan tillsats. Baserat på resultaten från optisk flödescytometri, manuell räknekammare och manuell räkning i monolayer på blod med iloprosttillsats hade sannolikt fyra av dessa 34 katter (12%) sann, men lindrig, trombocytopeni. Detta medför att andelen katter med pseudotrombocytopeni var 18% (sex av 34), enligt optisk räkning gjord på EDTA utan annan tillsats. Därmed var andelen blodprover av dålig kvalitet och med tydlig pseudotrombocytopeni i vår studie mycket lägre än i studien av Riond *et al.* (2012a). Skillnaden skulle eventuellt kunna bero på att vi var väldigt noggranna vid blodprovtagningen, försökte undvika tissue factor samt vaggade rören omedelbart och många gånger för att blodet skulle blandas ordentligt med antikoagulans och trombocytaktiveringshämmande medel. Motsvarande siffra för pseudotrombocytopeni, på blod taget i EDTA utan annan tillsats, var i Tvedten & Johanssons studie (2010) 20%. Antalet katter var här dock färre ($n = 10$) och ett annat optiskt instrument användes (Sysmex XT 2000iV).

Tvedten & Johansson (2010) visade att PGE effektivt motverkar trombocytaggregering och höjer trombocyträknningen. De redovisade en genomsnittlig differens i optisk PLT PGE – optisk PLT EDTA som var $141 \times 10^9/L$ större än motsvarande differens i vår studie. I båda försöken samlades blodet först i EDTA för att sedan föras över till rör med prostaglandin E1. Prepareringen med prostaglandin E1 var beredd på samma sätt. En tänkbar faktor som i vår studie kan ha påverkat trombocyträknningen negativt, är att tre antikoagulans användes i stället för två. Sannolikt gick det längre tid från det att blodproven togs till dess att blodet blandades med iloprost och prostaglandin E1. Ett flertal av de värmelabila prepareringarna med prostaglandin E1 hade även transporterats ut till kliniken i omgångar innan de slutligen användes, vilket gör att substansen riskerar att ha inaktiverats helt eller delvis. För framtida forskning och underlättad resultatbedömning rekommenderas standardiserad kanylstorlek,

standardiserade blodprovror samt att en provrörsvagga och frys finns tillgänglig i provtagningsrummet. På medgivan till försöksdeltagande bör djurägare även ombes ange hur lång tid som har förflutit sedan deras katt eventuellt har NSAID-behandlats. Preanalysatoriska felkällor medförandes pseudotrombocytopeni in vitro skulle eventuellt även kunna förebyggas genom att förpreparera EDTA-rör med iloprost. Ilomedin är dock ett potent läkemedel och det kan därför vara viktigt att se till att permanentkanyler inte kommer i kontakt med substansen i provtagningsrören och via denna väg råkar överföras till djuret.

När en tydlig skillnad i Advia PLT ILP och Advia PLT EDTA återfanns, kunde man samtidigt se att det på EDTA-blodutstrykens frans var många och stora trombocyttaggregat. Fransen återspeglade omfattningen av trombocyttaggregat bättre än monolayer. Mindre mängder aggregat (aggregatklassificering 1 och 2) tycktes inte ha någon betydande negativ inverkan på trombocyträknningen. Däremot kunde man se en tydlig minskning av PLT vid aggregatklassificering 4. Vid omfattande trombocyttaggregering (grad 4) bör därför inget trombocytvärde svaras ut, medan det vid aggregatklassificering 1 eller 2 kan betraktas som liten risk för klinisk missbedömning om trombocyträkningsresultatet rapporteras. Sambandet till aggregatklassificering 3 var mindre tydligt. Studiens definition av aggregatklassificering tycks ha fungerat bra för att upptäcka trombocyträkningsfel hos optiska instrument, och systemet för aggregatklassificering kan därmed få praktisk betydelse för laboratoriepersonal.

Inget medel mot hemostas lyckades fullständigt förhindra trombocyttaktivering och aggregering, och man bör därför fortsätta försöka hitta en ännu bättre metod. Om katten uppvisar symptom på trombocytopeni eller har en sjukdom som kan förknippas med låga trombocytvärden kan med fördel ett nytt blodprov med iloprosttillsats tas, oavsett om aggregatklassificeringen är 1 eller 4. Hos katter där flera metoder var överens om att trombocytopeni verkligen förelåg, kunde man ändå se att iloprost kan ha bidragit till en liten höjning i PLT. Att en av de fyra katterna med eventuell trombocytopeni hade lite högre PLT EDTA än PLT ILP kan bero på att det förelåg avsaknad av synliga trombocyttaggregat. Vid ingen eller minimal aggregatbildning kan inte iloprost höja PLT. Man bör dock komma ihåg att det alltid blir lite skillnad i trombocyträkningsresultat mellan olika metoder.

Vilken trombocyträkningsmetod som är bäst beror på blodprovets kvalitet. När det förekom många och stora trombocyttaggregat i blodet medförde manuell räknekammare tydligt högre PLT än Advia PLT. Manuell PLT var därför sannolikt bättre när det fanns aggregat. Orsaken till att PLT blev högre med manuell räknekammare är inte klarlagd, men kan bero på att man vid denna metod späder ut blodprovet med mer vätska som eventuellt löser upp somliga av trombocyttaggregaten. Vi använde huvudsakligen en BMA som är väldigt erfaren och duktig på att räkna trombocyter manuellt. Ingen metod är dock optimal för diagnos när provet är dåligt. Vid god blodprovskvalitet tycks Advia PLT och trombocyträkning med manuell räknekammare vara ungefär jämbördiga ($r^2 = 0,92$). Advia har här fördelen att det är ett automatiskt instrument, medan manuell räknekammare är mer tidskrävande och kräver högre kompetens. Advia analyserar dessutom tiotusentals trombocyter i jämförelse till manuell räknekammare i vilken man bara räknar tiotals till hundratals trombocyter. Advia PLT har härigenom tydligt bättre förutsättningar för bedömning av det sanna trombocytantalet. Detta

kan tyckas motsägelsefullt då den genomsnittliga standardavvikelsen var lägre vid trombocyträkning med manuell räknekammare än med Advia PLT. En fördel med manuell räknekammare är att man kan räkna mycket stora trombocyter. Hos Advia 2120 går gränsen vid 60 fl. Med manuell räknekammare kan man ibland även uppskatta antalet trombocyter i aggregat, men man kan inte med säkerhet räkna samtliga. Ibland är trombocyterna inte jämnt spridda i blodprovröret eller i räknekammaren, och manuell räkning kan även försvåras av damm, små partiklar och skador i räknekammarens glashölje. Automatiska instrument riskerar att felregistrera trombocytaggregat som leukocyter, alternativt registreras aggregaten inte alls (Powell & Torrance, 2012).

Advia PCT följde inte samma mönster som Advia PLT. Korrelationen (r^2) Advia PCT ILP och Advia PLT ILP var endast 0,57. Den låga korrelationen indikerar att MPV sannolikt har stor inverkan, enligt sambandet $PCT = PLT \times MPV$. Hos vissa katter fann man mycket hög PCT medan PLT var förhållandevis låg (till exempel en katt med PCT ILP 0,71 och PLT ILP 258). I och med att Advia presenterar PCT baserat på både PLT och MPV, bör Advia PCT ge en bättre bild av sann trombocytstatus än Advia PLT. Ett normalt referensintervall för kattens PCT bör därför upprättas. En nackdel med Advia är dock att man riskerar att missa de största trombocyterna och undervärdera PLT och PCT. Vid förekomst av trombocyter > 60 fl kan därför både Advia PLT och Advia PCT vara falskt låga.

QBC PLT visade på stor skillnad mellan EDTA, PGE och ILP. Korrelationen (r^2) mellan QBC PLT ILP och QBC PLT PGE var 0,72, medan korrelationen (r^2) mellan Advia PLT ILP och Advia PLT PGE var 0,98 ($n = 22$). Enligt Advia var trombocyträkningen från blodprover med ILP och PGE mycket lika. Förutsatt att detta stämmer, kan den låga korrelationen mellan QBC PLT ILP och QBC PLT PGE tala för att QBC har dålig förmåga för bedömning av trombocytstatus hos katt. Korrelationen (r^2) mellan QBC PLT EDTA och QBC PLT ILP var 0,55, medan den mellan Advia PLT EDTA och Advia PLT ILP var 0,56. Hos Advia kan korrelationen återspegla att ILP medförde bra prover medan EDTA resulterade i sämre blodprovskvalitet. Däremot kunde skillnad i QBC PLT ILP och QBC PLT EDTA inte relateras till olika blodprovskvalitet och den låga korrelationen hos QBC var sannolikt därför inte orsakad av trombocytaggregat.

I början var vår hypotes att QBC kunde utgöra gold standard för PCT, men de flesta resultaten talade för att QBC hos katt är en för osäker metod. Om de varierande resultaten i PLT inte orsakades av låg precision, skulle det innebära att MPV/PCT i blod från en och samma individ har varierat mycket mellan proverna med de olika substanserna. Att trombocytmassan från en och samma individs blodprovrör skulle variera så mycket är inte sannolikt. Samtidigt ingår flera manuella steg vid analys med QBC, varvid felkällor bland annat skulle kunna ha utgjorts av vickning av blodprovrör innan uppsug i hematokritrör, och att hematokritrör kan ha haft intorkat blod på utsidan vilket försvårade avläsningen. Vickning av blodprovrören skedde i denna studie manuellt, men skulle till kommande studier kunna förbättras med en automatisk vagga. Med inställd vagghastighet skulle trombocytfordelningen mellan olika blodprovrör eventuellt kunna bli mer jämn. Att korrelationen (r^2) QBC PLT och Advia PCT \times 657 endast var 0,66 kan återspegla både det faktum att QBC baserar sin PCT på PLT

multipliserat med ett standardiserat värde för djurslagets MPV samt att Advia kan ha missat trombocyter > 60 fl. Andelen trombocyter > 60 fl var sannolikt dock inte så stor att den kan ha orsakat denna låga korrelation. Hos CKCS överensstämde Advia PCT relativt bra med QBC PLT (Tvedten *et al.*, 2012). Hos de CKCS vars Advia PLT redovisade lägst trombocyträkning var dock skillnaden mellan QBC PLT och Advia PCT större än hos CKCS vars Advia PLT rapporterades vara högre. Sannolikt orsakades detta av makrotrombocyter så stora att Advia inte kunde registrera dem.

En annan teori till den låga korrelationen mellan QBC PLT och Advia PLT i vår studie vore om centrifugeringsprocessen som syftar till att dela in celler efter olika densitet (p) inte är fullt tillämpbar på kattens trombocyter. Aggregerade trombocyter gav, enligt tidigare forskningsresultat från optisk cellräknare, signifikant högre MPV än oaggregerade trombocyter ($18,3 \pm 2,6$ fl respektive $14,2 \pm 1,3$ fl) (Zelmanovic & Hetherington, 1998). Vid aktivering av trombocyter frisätts granulae, något som kan tänkas minska massan (m). Enligt formeln för densitet, $p = m/V$, bör densiteten för aggregerade trombocyter kunna minska. Skillnad i densitet kan även tänkas förekomma mellan oaggregerade trombocyter, då påvisad volymvidd är minst 14,2 fl (Weiser & Kociba, 1984) till 60 fl (Zelmanovic & Hetherington, 1998). Om eventuell densitetminskning inverkar på QBC-instrumentets centrifugeringsindelning är inte känt, men om cellindelningen skulle påverkas vore det mest sannolikt att trombocyterna hamnar i plasmalagret. Baserat på resultaten från vår studie kan vi ännu inte rekommendera QBC PLT för katt.

Med QBC EDTA hade två av de 22 katterna med slutgiltig trombocyträkning $PLT < 200 \times 10^9/L$. Enligt Advia resulterade tre av dessa 22 katters EDTA-blod i $PLT < 200 \times 10^9/L$. För ILP och PGE var antalet katter med trombocytopeni lika många med QBC och Advia. Enligt en studie där man på CKCS jämförde trombocyträkning med optisk räkning (Sysmex XT 2000-iV) med trombocyträkning med QBC, hade 14 av 27 (52%) PLT förenligt med trombocytopeni enligt optisk räkning (Tvedten *et al.*, 2008). Sett till QBC PLT hade däremot ingen av hundarna trombocytopeni. I en studie där man på katters EDTA-blod jämförde QBC PLT med PLT från manuell räknekammare var PLT från manuell räknekammare i genomsnitt cirka $87 \times 10^9/L$ högre än resultaten från QBC (Tasker *et al.*, 2001). I vår studie resulterade i stället QBC i högre genomsnittlig PLT än manuell räknekammare, sett till samtliga antikoagulans. Om det QBC-instrument som användes i studien av Tasker *et al.* (2001) hade samma inställningar för MPV som QBC-instrumentet i vår studie är dock okänt. I och med att QBC PLT beräknas med ett standardiserat värde på MPV, är det heller inte osannolikt att redovisad PLT i vår studie var falskt hög. Korrelationskoefficienten (r) i studien av Tasker *et al.* (2001) mellan manuell räknekammare PLT och QBC PLT var 0,54, i motsats till 0,44 i denna studie (n = 29). Korrelationskoefficienten var därmed låg i båda studierna.

Sammanfattningsvis var genomsnittlig PLT ILP inte så mycket högre än genomsnittlig PLT EDTA (n = 21), men i flera fall där omfattande aggregering förelåg lyckades man dock med tillsats av iloprost markant höja trombocyträkningen. Liten ökning i PLT kunde även ses i några fall med sann trombocytopeni. ILP hade även större effekt mot aggregatbildning än PGE, och i och med att ILP är temperaturstabil har det även den stora fördelen att det är mer

lätthanterligt än PGE. Substansen är dessutom mycket billigare. En preparering med 40 ng iloprost per provrör skulle endast medföra en extra kostnad a 53 öre, i jämförelse med prostaglandin E1 100µg vilket kostar 50 kronor. Iloprost bör användas kliniskt vid blodprovstagning av katter.

Trombocyträkningen påverkades negativt främst vid omfattande trombocytaggregering. Vid god blodprovskvalitet är Advia en mer praktisk och precis metod än manuell räknekammare. Vid omfattande trombocytaggregering gav manuell räkning högre PLT än automatisk räkning med optisk flödescytometri. Advia PCT är, enligt teorin, sannolikt mer fysiologiskt rätt än Advia PLT. Om man kan bevisa att Advia PCT bättre återspeglar kattens trombocytstatus, och förutsatt att kattblod inte har en så hög andel makrotrombocyter att Advia PCT blir falskt lågt, kan Advia PCT komma att få stor klinisk betydelse. Ett normalt referensintervall för kattens PCT bör upprättats. QBC PLT visade, trots avsaknad på samband till olika blodprovskvalitet, tydligt varierande PLT mellan EDTA, PGE och ILP. QBC-analyserna var dessutom tidskrävande. Nyttan av QBC hos katt kan därför, i jämförelse till nyttan av QBC hos hundrasen CKCS, ifrågasättas.

ACKNOWLEDGEMENTS

Jag vill rikta ett stort tack till min huvudhandledare, Harold Tvedten, som har varit mycket engagerad, tillmötesgående och hjälpsam. Jag vill även tacka min biträdande handledare, Inger Lilliehöök, som bland annat initierade projektet med många av de grundläggande hypoteserna och en bra praktisk introduktion, samt alla övriga som har bidragit till att möjliggöra studien, bland annat BMA Annika Thor-Asplund, Gabriella Ågren och Laila Olsson vid klinisk kemiska laboratoriet, personal vid UDS smådjursenhet, samt Agria Djurförsäkring som genom sitt forskningsanslag hjälpte till med finansiering.

REFERENSER

- Bertalozzo, W., Comazzi, S., Sesso, L., Scarpa, P., Ru, G. & Paltrinieri, S. (2007) Comparison of methods for determining platelet numbers and volume in cavalier King Charles spaniels. *Journal of Small Animal Practice*, 48, 556-561.
- Cowan, S.M., Bartges, J.W., Gompf, R.E., Hayes, J.R., Moyers, T.D., Snider, C.C., Gerard, D.A., Craft, R.M., Muenchen, R.A. & Carroll, R.C. (2004) Giant platelet disorder in the Cavalier King Charles Spaniel. *Experimental Hematology*, 32, 344-350.
- Fass. 2012-09-12. Läkemedelsfakta Bipacksedel Ilomedin® Bayer. Koncentrat till infusionsvätska, lösning 20 mikrog/ml.
http://www.fass.se/LIF/produktfakta/artikel_produk_t.jsp?NplID=19971219000106&DocTypeID=7
(Hämtad 2012-12-12)
- Gelain, M.E., Tutino, G.F., Pogliani, E. & Bertalozzo, W. (2010) Macrothrombocytopenia in a group of related Norfolk terriers. *Veterinary Record*, 167, 493-494.
- Jones, B. (2010) Inledning. In: *Kompendium i klinisk kemi*. 9-17. Uppsala, Sverige.
- Jordan, H.L., Grindem, C.B. & Breitschwerdt, E.B. (1993) Thrombocytopenia in Cats: A retrospective study of 41 cases. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 7, 261-265.
- Kohn, B., Linden, T. & Leibold, W. (2006) Platelet-bound antibodies detected by a flow cytometric assay in cats with thrombocytopenia. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 8, 254-260.
- Lilliehöök, I. & Tvedten, H. (2009) Validation of the Sysmex XT-2000iV hematology system for dogs, cats and horses. I. Erythrocytes, platelets and total leukocyte counts. *Veterinary Clinical Pathology*, 38, 163-174.

- Mischke, R. (2012) Overview of haemostasis. In: *BSAVA Manual of Canine and Feline Haematology and Transfusion Medicine*. 2nd ed. 182-188. Quedgeley, Gloucester, U.K.
- Nelson, R.W. & Couto, C.G. (2009) Disorders of Hemostasis. In: *Small Animal Internal Medicine*. 4th ed. 1242-1259. St. Louis, Missouri.
- Norman, E.J., Barron, R.C.J., Nash, A.S. & Clampitt, R.B. (2001a) Prevalence of low automated platelet counts in cats: comparison with prevalence of thrombocytopenia based on blood smear estimation. *Veterinary Clinical Pathology*, 30, 137-140.
- Norman, E.J., Barron, R.C.J., Nash, A.S. & Clampitt, R.B. (2001b) Evaluation of a citrate-based anticoagulant with platelet inhibitory activity for feline blood cell counts. *Veterinary Clinical Pathology*, 30, 124-132.
- Pedersen, H.D., Häggström, J., Olsen, L.H., Christensen, K., Selin, A., Burmeister, M.L. & Larsen, H. (2002) Idiopathic asymptomatic thrombocytopenia in Cavalier King Charles Spaniels is an autosomal recessive trait. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 16, 169-173.
- Powell, R. & Torrance, A. (2012) Introduction to haematological diagnostic techniques. In: *BSAVA Manual of Canine and Feline Haematology and Transfusion Medicine*. 2nd ed. 1-20. Quedgeley, Gloucester, U.K.
- Riond, B., Waßmuth, A.K., Hartnack, S., Hofmann-Lehmann, R. & Lutz, H. (2012a) Effective prevention of pseudothrombocytopenia in feline EDTA blood samples with the prostaglandin I₂-analogue Iloprost. *15th Congress of the International society for animal clinical pathology, and/or 14th Conference of the European Society of Veterinary Clinical Pathology*, 3rd-7th July, 2012, University of Ljubljana, Veterinary Faculty, Ljubljana, Slovenia. Kongressproceedings, sid 162.
- Riond, B., Waßmuth, A.K., Hartnack, S., Hofmann-Lehmann, R. & Lutz, H. (2012b) Kinetics and characteristics of feline platelet aggregation in vitro. *15th Congress of the International society for animal clinical pathology, and/or 14th Conference of the European Society of Veterinary Clinical Pathology*, 3rd-7th July, 2012, University of Ljubljana, Veterinary Faculty, Ljubljana, Slovenia. Kongressproceedings, sid 161.
- Sjaastad, Ø.V., Hove, K. & Sand, O. (2003) Blood and its function. In: *Physiology of Domestic Animals*. 282-303. Scandinavian Veterinary Press, Oslo.
- Tasker, S., Cripps, P.J. & Mackin, A.J. (1999). Estimation of platelet counts on feline blood smears. *Veterinary Clinical Pathology*, 28, 42-45.
- Tasker, S., Cripps, P.J. & Mackin, A.J. (2001). Evaluation of methods of platelet counting in the cat. *Journal of Small Animal Practice*, 42, 326-332.
- Tvedten, H., Lilliehöök, I., Hillström, A. & Häggström, J. (2008) Plateletcrit is superior to platelet count for assessing platelet status in Cavalier King Charles Spaniels. *Veterinary Clinical Pathology*, 37, 266-271.
- Tvedten, H. & Johansson, P. (2010) Feline platelet counting with prostaglandin E1 on the Sysmex XT-2000iV. *Veterinary Clinical Pathology*, 39, 190-192.
- Tvedten, H., Lilliehöök, I., Öberg, J., Häggström, J., Höglund, K. & Ljungvall, I. (2012) Validation of Advia plateletcrit for assessing platelet mass in dogs, including Cavalier King Charles Spaniels. *Veterinary Clinical Pathology*, 41, 336-343.
- Tvedten, H. Professor, Statens Lantbruksuniversitet, Institutionen för kliniska vetenskaper. Uppsala. Personligt meddelande, E-mailkorrespondens, 2012-11-05.
- Webb, D.I., Parker, L. & Webb, K. (2004). Platelet count assessment from peripheral blood smears (PBS). *Alaska Medicine*, 46, 92-95.
- Weiser, M.G. (1983) Comparison of two automated multi-channel blood cell counting systems for analysis of blood of common domestic animals. *Veterinary Clinical Pathology*, 12, 25-32.
- Weiser, M.G. & Kociba, G.J. (1984) Platelet concentration and platelet volume distribution in healthy cats. *American Journal of Veterinary Research*, 45, 518-522.
- Welles, E.G., Bourne, C., Tyler, J.W. & Boudreaux, M.K. (1994) Detection of activated feline platelets in platelet-rich plasma by use of fluorescein-labeled antibodies and flow cytometry. *Veterinary Pathology*, 31, 553-560.
- Zelmanovic, D. & Hetherington, E.J. (1998) Automated analysis of feline platelets in whole blood, including platelet count, mean platelet volume, and activation state. *Veterinary Clinical Pathology*, 27, 2-9.